Agilent ChemStation

Informationen zu Ihrer ChemStation

Agilent Technologies

© Copyright Agilent Technologies 2000

Änderungen vorbehalten. Die Reproduktion, Anpassung oder Übersetzung in eine andere Sprache ist ohne vorherige schriftliche Genehmigung unzulässig, es sei denn, diese erfolgen innerhalb der Grenzen des Urheberrechtes.

Publikationsnummer G2070-92113

Ausgabe 04/00

Gedruckt in Deutschland

Dieses Handbuch bezieht sich auf die Version A.08.xx der ChemStation-Software, wobei xx eine Zahl von 00 bis 99 ist und kleinere Änderungen der Software bezeichnet, die keinen Einfluß auf die technische Richtigkeit dieses Handbuches haben.

Adobe™ ist ein Waren zeichen der Adobe Systems Incorporated.

Microsoft® , MS-DOS®, MS Windows®, Windows® und Windows NT® sind eingetragenen Warenzeichen der Microsoft Corp.

Pentium® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Intel Corporation.

PostScript™ ist ein eingetragenes Warenzeichen der Adobe Systems Incorporated.

Gewährleistung

Alle Informationen in diesem Dokument können geändert werden, ohne dass es dafür einer Ankündigung bedarf.

Agilent Technologies übernimmt für dieses Material in keiner Weise eine Garantie und macht keinerlei Zusagen zur Nutzbarkeit oder Eignung dieses Materials für einen bestimmten Zweck.

Agilent Technologies kann nicht für etwaige enthaltene Ausstattung, Fehler und die zufälligen oder zwingenden Folgen im Zusammenhang mit Ausstattung, Leistungsfähigkeit oder Gebrauch dieses Materials haftbar gemacht werden.

Agilent Technologies Deutschland GmbH
Hewlett-Packard-Strasse 8
76337 Waldbronn
Deutschland

Informationen zu Ihrer ChemStation

In diesem Handbuch

In diesem Handbuch werden die verschiedenen Konzepte der ChemStation beschrieben. Sie können damit einen Einblick in die Funktionsweise Ihrer ChemStation gewinnen.

Informationen zur Verwendung der ChemStation finden Sie im Online-Hilfesystem sowie im integrierten Tutorial.

Inhalt

1 ChemStation Konzepte

Allgemeine Beschreibung 13
ChemStation Hardware 16
Zur ChemStation Software 17
Gerätesteuerung 33
Dokumentation 34
Die Verzeichnisstruktur der ChemStation 36

2 Methoden

Was ist eine Methode? 43
Die Bestandteile einer Methode 44
Der Status von Methoden 46
Erstellen von Methoden 47
Editieren von Methoden 48
Verzeichnisstruktur von Methoden 50
Was geschieht während der Ausführung einer Methode? 51
Zusammenfassung des Methodenablaufs 56

3 Datenerfassung

Was ist Datenerfassung? 59
Datensätze 60
Online-Monitore 62
Logbuch 63
Statusinformationen 64

4 Integration

Was ist eine Integration? 69
Was wird bei der Integration durchgeführt? 70
Die Integrationsalgorithmen der ChemStation 71

5 Der Standardintegrationsalgorithmus

Der Standardintegrationsalgorithmus 77
Funktionsweise der Integration 78
Peakerkennung 79
Konstruktion der Basislinie 83
Codes zur Beschreibung der Peaktrennung 84
Berechnung der Peakfläche 88
Integrationsparameter 91
Tabellen mit Integrationsparametern 98
Integrationsmethoden 99
Autointegration 100
Integration 102
Manuelle Integration 103

6 Der neue Integrationsalgorithmus

Der neue Integratoralgorithmus 109
Wie wird der neue Integrator an eine Konfiguration angepaßt? 110
Funktion des verbesserten Integrators 111
Integrieren von Peaks in der Praxis 115
Mehr über den neuen Integrator 116
Peakerkennung 117
Basislinienbestimmung 123

Codes zur Beschreibung der Peaktrennung 125
Berechnung der Peakfläche 131
Integrationsparameter 134
Tabellen mit Integrationsparametern 139
Anwendung des neuen Integrators 140
Integration 141
Autointegration 142
Manuelle Integration 144

7 Peak Identification (Peakerkennung)

Was ist eine Peakidentifizierung? 149
Regeln zur Peakübereinstimmung 150
Möglichkeiten der Peakidentifizierung 151
Absolute Retentions- bzw. Migrationzeit 152
Korrigierte Retentions- bzw. Migrationszeiten 154
Peakqualifier 156
Die Durchführung der Identifizierung 159

8 Quantifizierung

Was ist Quantifizierung? 163
Rechenmethoden in der Quantifizierung 164
Korrekturfaktoren 165
Unkalibrierte Rechenmethoden 167
Kalibrierte Rechenverfahren 168
Berechnungen mit externem Standard (ESTD) 169
Berechnung von Norm% 171
Berechnungen mit internem Standard (ISTD) 172

9 Kalibrierung

Definition der Begriffe 179
Kalibriertabelle 180
Kalibrierkurve 181
Unbekannte Proben 183
Kalibrierverfahren 184
Gruppenkalibrierung 191
Peakaddition 192
Rekalibrierung 193

10 Automatisierung

Was ist Automatisierung? 199
Was ist eine Sequenz? 200
Sequenzparameter 201
Sequenztabelle 202
Erstellen einer Sequenz 203
Arbeiten mit Sequenzen 204
Logbuchdatei einer Sequenz 207
Was geschieht während der Ausführung einer Sequenz? 208
Vergabe von Dateinamen in einer Sequenz 209
Aktionen nach der Sequenz 211
Automatische Rekalibrierung 212
Spezifizieren von Rekalibrierungen 213
Sequenztypen 216
Explizite Kalibriersequenzen 217
Zyklische Kalibriersequenzen eines Kalibrierpunkts 218
Zyklische Kalibriersequenzen mit mehrerer Kalibrierpunkte 219
Kombination aus expliziter und zyklischer Kalibrierung 223

Umschließende zyklische Kalibriersequenzen (Bracketing) 226
Zyklische Rekalibriersequenzen mit mehreren Probenfläschchen, die dieselbe Standardverdünnung enthalten 230

11 Batch-Review

Was versteht man unter Batch-Review? 237
Batch-Konfiguration 238
Funktionen für den Review 240
Batch-Reports 241

12 Verwendung der ChemStation Reports

Was ist ein Report? 245
Reportergebnisse 246
Quantitative Ergebnisse 248
Reportvorlagen 250
Weitere Parameter für die Reportvorlagen 253
Reportausgabe 254
Sequence Summary Reporting 256

13 Ermittlung der Systemleistung

Bestimmung des Rauschens 265
Berechnung der Peaksymmetrie 268
Formeln und Rechenmethoden zur Beurteilung der Systemleistung 270
Allgemeine Definitionen 271

Definitionen des Leistungstests 272
Definitionen der Reproduzierbarkeit 278
Interner gespeicherter Doppelpräzisions Zahlenzugriff 283

14 Überprüfung des Systems

Überprüfung des Systems 288
Das Register “GLPsave” 291
Die Funktion “DAD Test” 293

1

ChemStation Konzepte

ChemStation Konzepte

In diesem Kapitel werden die Hauptkomponenten und die wichtigsten Merkmale der ChemStation beschrieben. Aufgabenspezifische Hilfe zu Ihrer ChemStation finden Sie in der Online-Hilfe oder dem ChemStation-Tutorial, das zusammen mit Ihrer Software geliefert wird.

Allgemeine Beschreibung

Die ChemStations für GC, LC, LC/MSD, CE und A/D Systeme dienen der Gerätesteuerung, der Datenaufnahme und der Datenauswertung für

- HP 5890 Gaschromatographen der Serie II und der Agilent 6890 Serie,
- Module und LC-Systeme der Agilent 1100 Serie,
- LC/MSD der Agilent 1100 Serie,
- Flüssigkeitschromatographen der HP 1090 Serie,
- Module für Flüssigkeitschromatographen der HP 1050 Serie,
- Agilent Kapillarelektrophorese-System und
- Agilent 35900C/D/E Zweikanalschnittstellen für A/D-Wandler.

Die Software ist zum Einsatz auf IBM-kompatiblen Personalcomputern unter der Arbeitsumgebung von Microsoft®Windows NT 4.0 ausgelegt.

Die Software wird als Einzelgeräte ChemStation in fünf Versionen verkauft. Alle Versionen umfassen die Datenerfassung, Gerätesteuerung, Datenauswertung (Integration, Quantifizierung und Reporterstellung) sowie die Automatisierung und Anpassung eines Analysengerätes. Jedes Gerätemodul hat seinen eigenen Zeitablauf und kann dabei Daten simultan aus verschiedenen Detektoren aufzeichnen. Die fünf Versionen sind:

- eine Einzelgeräte ChemStation für Gaschromatographiesysteme (GC), Bestellnummer: G2070AA,
- eine Einzelgeräte ChemStation für Flüssigkeitschromatographie-Systeme (LC), Bestellnummer G2170AA,
- eine Einzelgeräte ChemStation für Flüssigkeitschromatographie-Systeme mit massenselektivem Detektor (LC/MSD), Bestellnummer G2710AA,
- eine Einzelgeräte ChemStation für Kapillarelektrophorese-Systeme (CE), Bestellnummerr G1601A und
- eine Einzelgeräte (A/D) ChemStation für für die Erfassung von Analogdaten mit externer Gerätesteuerung, Bestellnummer G2072AA.

Die Möglichkeiten zur Gerätesteuerung mit der ChemStation Software können durch den Erwerb zusätzlicher Gerätemodule erweitert werden. Dies ermöglicht gemischte Konfigurationen mit mehreren Analysengeräten.

Zusätzliche Gerätemodule

Folgende zusätzlichen Gerätemodule stehen zur Verfügung:

- Zusätzliches Modul zur GC-Steuerung und Datenaufnahme, Bestellnummer G2071AA.
- Zusätzliches Modul zur LC-Steuerung und Datenaufnahme, Bestellnummer G2171AA,
- Zusätzliches Modul zur LC/MSD-Steuerung und Datenaufnahme, erweiterbar auf die Datenauswertung, Bestellnummer G2715AA,
- Zusätzliches Modul zur CE-Steuerung, Datenaufnahme und -verarbeitung, Bestellnummer G2172AA,
- Zusatzmodul zur analogen Datenerfassung, Bestellnummer G2073AA.

Zusätzliche Datenbearbeitungsmodule

Die Möglichkeiten zur Datenbearbeitung mit der ChemStation können durch den Erwerb zusätzlicher Datenbearbeitungsmodule erweitert werden, hauptsächlich für Spezialanwendungen:

- Zusätzliches Modul zur Spektrenauswertung des Dioden-Array-Detektors (DAD), Bestellnummer G2180AA,
- Zusätzliches Datenbankmodul ChemStore zur Organisation von Daten und Ergebnissen, Bestellnummer G2181AA,
- Zusätzliches Datenbearbeitungsmodul für die Auswertung und Bioanalyse von LC/MSD-Daten, Bestellnummer G2720AA, nur für die LC/MSD ChemStation.

An jede ChemStation können bis zu vier chromatographische Geräte angeschlossen werden. Wenn Geräte mit spektroskopischen Detektoren (Dioden-Array-Detektoren für LC oder CE) angeschlossen sind, können von einer ChemStation lediglich zwei Dioden-Array-Detektoren gesteuert werden; die Anzahl der zu steuernden Geräte verringert sich auf drei. Wenn die ChemStation für den LC/MSD zur Steuerung eines LC/MSD-Moduls der Serie 1100 (optional mit einer LC der Serie Agilent 1100 oder HP 1090 Series II) verwendet wird, kann vom PC kein weiteres Gerät unterstützt werden.

Produkte zur Datenauswertung

Es sind auch drei Produkte zur Datenauswertung verfügbar, die ohne angeschlossene Analysensysteme funktionieren. Sie sind zur Datenauswertung in Büroumgebungen ausgelegt:

- Die ChemStation für die Datenauswertung, Bestellnummer G2090AA, verfügt über dieselben Möglichkeiten der Datenauswertung wie die ChemStations.
- Die ChemStation für LC 3D-Datenauswertung, Bestellnummer G2190AA, verfügt über eine Diodenarray-Spektrenauswertung und die Möglichkeiten der ChemStation für die Datenauswertung.
- Die ChemStation für LC/MSD Datenauswertung, Bestellnummer G2730AA, verfügt über Diodenarray-Spektrenauswertung, Massenspektrenauswertung sowie die Möglichkeiten der ChemStation für Datenauswertung.

ChemStation Hardware

Nähere Informationen zur ChemStation Hardware finden Sie bei *Installieren Ihrer ChemStation*.

Zur ChemStation Software

Betriebssystem

Die ChemStation erfordert entweder Microsoft Windows NT 4.0, erweitert mit dem Micrsoft Service Pack 3 (SP3) oder das Betriebssystem Windows 95.

Für die Control Charts Funktion der ChemStation benötigt man Microsoft Excel 97.

Methoden und Sequenzen

Eine analytische Methode ist die vollständige Beschreibung einer speziellen Trennung. Sie enthält alle Parameter zur Gerätesteuerung, der Datenerfassung und Auswertung, einschließlich Integration, Quantifizierung und Reporterstellung. Das System kann so konfiguriert werden, daß es Daten von verschiedenen Proben mit verschiedenen Methoden aufnimmt. Die Steuerdatei für eine solche Folge heißt Sequenz und enthält Informationen zu den einzelnen Proben. Sie greift auf die geeigneten Methoden und die Angaben zur Rekalibrierung zu. Weitere Informationen zu Methoden und Sequenzen entnehmen Sie bitte Kapitel10 “Automatisierung” und dem Online-Hilfesystem.

Systemkonfiguration

Die Konfiguration eines Analysengerätes erfolgt mit Hilfe des Konfigurationsprogrammes. Es ermöglicht Ihnen die Definition Ihres Analysengerätes, dessen GPIB- oder LAN-Adressen, die Verzeichnisse zur Speicherung von Daten, Sequenzen, Methoden und Farbdefinitionen der ChemStation Software. Weitere Informationen entnehmen Sie bitte dem Handbuch, das mit Ihren zusätzlichen ChemStation-Modulen mitgeliefert wurde.

Datenmodell

Das Datensystem der ChemStation basiert auf bestimmten Speicherstrukturen, die als Register bezeichnet werden. Register sind zweckmäßige Strukturen, die analystische Daten und Informationen zweidimensional (z.B. mit Zeit- und Intensitätsachse) und dreidimensional (z.B. mit Zeit-, Intensitäts, und Wellenlängenachse) ablegen können. Mittels

verschiedener Befehle und Fuktionen läßt sich die Funktionalität der ChemStation erweitern.Weitere Informationen entnehmen Sie bitte dem *Macro Programming Guide*, der über die Online-Hilfe verfügbar ist.

Gliederung der Software

ChemStation-Software ist in mehrere Hauptmenüs gegliedert. In die Softwarekonfiguration sind standardmäßig folgende drei Hauptmenüs eingebunden:

- “Method und Run Control” zur Kontrolle des Geräts und zur Datenaufnahme,
- “Data Analysis” zum Wiederaufrufen und Auswerten bereits aufgenommener Daten und
- “Report Layout” zum Erstellen bestimmter Reportvorlagen.

Für weitere Datenauswertungsmodule oder bestimmte Gerätekonfigurationen, die Fehlerdiagnosen und Geräteüberprüfungen ermöglichen, gibt es weitere Hauptmenüs. Zudem kann zu der ChemStation das Hauptmenü "Companion" installiert werden, wenn Gerätebediener Proben bequem über eine vorgefertigte Tabelle abarbeiten können sollen.

Jedes Hauptmenü besteht aus einer Reihe der standardmäßigen Anwenderelemente wie Menüs und Symbolleisten. Die voreingestellte Symbolleiste bietet schnellen Zugriff auf allgemeine Informationen zur Gerätespezifikation wie Methoden und Sequenzen. Das Hauptmenü “Method und Run Control” enthält zusätzlich eine Informationszeile über den Gerätestatus, ein Informationsfeld zur Probe, das sowohl für einzelne als auch automatisierte Läufe festgelegt werden kann und für GC, LC und CE-Konfigurierungen eine schematisch dargestellete Geräteschnittstelle. Über dieses schematisch Benutzerinterface kann man sehr schnell auf die Geräteparameter zugreifen, wobei ein graphischer Überblick über den Status jeder folgenden Analyse gegeben wird. Man kann die schematisch dargestelllte Geräteschnittstelle auch ausschalten, um Arbeitsspeicherplatz und andere Speicherquellen von Windows zu sparen.

Das Hauptmenü ”Data Analysis” (Datenauswertung) erweitert die Standardsymbolleiste um bestimmte Datenauswertungsmodi einschließlich Integration, Kalibrierung, Reporterstellung, Beschriftungsmöglichkeiten, Signalvergleich und eventuell speziellen weiteren Modi. Jeder dieser einzelnen Datenauswertungsmodi wird durch ein artspezifisches Symbolset unterstützt.

Das Hauptmenü “Report Layout” ermöglicht es Ihnen die äußere Form einer bestimmten Reportart bezogen auf die Objekte graphisch festzulegen. Auch dieses Hauptmenü enthält eine Symbolleiste, die speziell für diese Aufgaben ausgelegt ist.

Datenerfassung

Der Status der Analysengeräte wird kontinuierlich verfolgt und auf dem Bildschirm zusammen mit der abgelaufenen Analysenzeit angegeben, wenn die ChemStation als sichtbares Fenster oder als Symbol ausgeführt wird. Alle Ereignisse aus einem Analysenlauf, einschließlich aller Fehlermeldungen und der Bedingungen der Analysengeräte bei Start und Ende des Laufes, werden in einem Logbuch des Systems abgelegt, ein Auszug wird in jedem Datensatz gespeichert.

Gerätebedingungen wie Flußrate, Temperatur, Druck und die Lösungsmittelzusammensetzung von LC-Systemen können aufgezeichnet und in jedem Datensatz gespeichert werden. Diese Bedingungen können angezeigt und als Beleg der Analysenqualität ausgedruckt werden. Genaue Einzelheiten der gespeicherten Parameter hängen von der Methode und den Möglichkeiten des gewählten Analysengerätes ab.

Ein weiteres Darstellungsfenster kann dazu verwendet werden, die vom Gerät aufgenommen Daten in einer Echzeit-Anzeige anzugeben. Die Daten werden in ihrer tatsächlichen Meßeinheit wie mAU, Volt oder bar angegeben. Jedes der Fenster kann meherere übereinander gelegte Chromatographiesignale oder Geräteparameter, wie z.B. den Druck enthalten. Die Voreinstellung der Anzeige kann angepaßt werden und wird vom System gespeichert, so daß der Anwender eine eigene bevorzugte Einstellung als Standardeinstellung für das Gerät festsetzen kann. Das Fenster ist zoomfähig und mit Hilfe des Cursors kann der Wert für ein bestimmtes Signal zu jeder Zeit der Messung abgerufen werden.

Die gesamte Funktionalität der ChemStation kann auch während laufender Analysen durch eine Offline-Session genutzt werden.

Für Anwender, die mit der Datenauswertung beginnen wollen, bevor die Datenerfassung abgeschlossen ist, steht der Snapshot-Befehl zur Verfügung.

Die Layouts der Signal- und Statusinformations-Fenster, einschließlich der Bestandteile der schematisch dargestelllten Geräteschnittstelle, werden automatisch gespeichert.

Weitere Informationen zur Datenaufnahme entnehmen Sie bitte Kapitel3 “Datenerfassung” und dem Online-Hilfesystem.

Datenauswertung — Darstellung

Die Ansicht von “Data Analysis” (Datenauswertung) enthält die Standardsymbolleiste, um aufgabenorientierte Funktionen zur Datenauswertung, einschließlich der Symbole für Integration, Kalibrierung, Reporterstellung, Beschriftungsmöglichkeiten und Signalvergleich auszuführen. Im folgenden sind die wichtigsten Graphikfunktionen aufgeführt:

- Darstellungen im Einzel- oder Mehrfachsignalmodus, wählbar beim Laden des Chromatogramms;
- Überlagern von Chromatogrammen verschiedener Proben;
- Abziehen eines Chromatogramms von einem anderen;
- graphische Anpassung der Signale in vertikaler und horizontaler Richtung, um den visuellen Vergleich zu vereinfachen;
- Signalumkehr oder -spiegelung, um den visuellen Vergleich zu vereinfachen;
- graphische Funktionen zum Zoomen oder Verschieben;
- Festlegung der Darstellungsmerkmale, wie z.B. der Auswahl von Markierungen, Basislinien, Achsen, Retentionszeiten und Substanznamen (der Anwender kann auch die Schriftart der Retentionszeit und der Substanznamen festlegen, die Größe und Ausrichtung der Darstellung bestimmen, auswählen, ob die Darstellung überlagert oder getrennt erfolgen soll und die Skalierungsfaktoren festsetzen);
- die Darstellung des Chromatogramms kann, je nach den Möglichkeiten des angeschlossenen Gerätes, auch mit Verläufen der Geräteparameter überlagert sein;
- Anmerkungen können vom Anwender definiert und in die Darstellung eingefügt werden, wobei die Schriftart und -größe sowie die Ausrichtung und Farbe wählbar sind (eine einmal definierte Anmerkung kann graphisch verschoben, editiert oder gelöscht werden);
- Kopieren der Darstellung in die Windows Zwischenablage als Metafile oder im Bitmap-Format,
- eine *pick mode* -Funktion ermöglicht die Ausgabe von Werten für einzelne Datenpunkte in Detektoreinheiten;
- Export von digitalisierten Werten in die Windows Zwischenablage.

Datenauswertung — Integration

Die ChemStation enthält zwei Integrationsalgorithmen. Der traditionelle Integrationsalgorithmus war Bestandteil der früheren Versionen der ChemStation und befindet sich in den meisten anderen Auswertesoftware-Paketen für analytische Daten von Agilent Technologies. Der neue Integrationsalgorithmus zielt auf bessere Robustheit, Zuverlässigkeit und Anwenderfreundlichkeit ab. Für diese Softwareversion empfehlen wir den Einsatz des traditionellen Algorithmus für bereits vorhandene validierte Methoden und des neuen Algorithmus für neue Methoden.

Allgemeine Integrationsmöglichkeiten

Die wichtigsten Möglichkeiten beider Integrationsalgorithmen sind folgende:

- eine Autointegrationsfunktion zur Einstellung anfänglicher Integrationsparameter;
- die Fähigkeit, für jedes Chromatographiesignal eine eigene Tabelle mit Integrationsparametern festzulegen, wenn mehrere Signale oder mehr als ein Detektor verwendet werden;
- die interaktive Festlegung von Integrationsparametern, die es dem Anwender ermöglichen, die Zeiten für die Ereignisse graphisch zu bestimmen;
- manuelle oder “Rubber Band” Integration für Chromatogramme oder Elektropherogramme, die eine spezielle Interpretation erfordern (diese Parameter können auch in die Methode integriert und somit automatisch aufgerufen werden);
- Darstellung und Ausdruck von Integrationsergebnissen und
- die Fähigkeit mindestens 1000 Peaks pro Chromatogramm zu integrieren.

Beide Integrationsalgorithmen enthalten folgende Befehlsgruppen:

- Definitionen für Integrationsparameter, um die Grundeinstellungen für den Integrator, Area Rejection, Peak Width und Threshold (als Parameter für die Rauschunterdrückung), festzusetzen oder zu verändern;
- Parameter zur Kontrolle der Basislinie wie “force baseline” (Basislinie erzwingen), “hold baseline” (Basislinie halten), “baseline at all valleys” (Basislinie zu jedem Tal), “baseline at the next valley” (Basislinie beim nächsten Tal), “fit baseline backwards from the end of the current peak” (rückwärtige Anpassung der Basislinie vom Ende des aktuellen Peaks);

- Kontrolle der Flächenaddition;
- negative Peakerkennung,
- Abtastprozesse einschließlich Befehlen zur Festlegung des Lösungsmittelpeaks und
- Befehle zur Integratorsteuerung, die Retentionszeitbereiche festlegen, in denen der Integrator wirksam ist.

Der neue Integrationsalgorithmus

Der neue Integrationsalgorithmus bietet Verbesserungen bezüglich:

- Basislinienzuweisungen für Peaks bei Chromatogrammen und Elektropherogrammen mit driftender Basislinie;
- Erkennung “negativer Flächen” bei tangential angepassten Peaks; das Problem wird über eine Änderung des Basislinienverlaufes beseitigt,
- optionale Messung und Berechnung von Flächen, die zwischen der Basislinie und dem Signal auftreten und keinem bekannten Peak zugewiesen werden können,
- zusätzliche Anfangsparameter zum Ausschluß von Peaks, die durch Rauschen entstanden sind (anfängliche Peakhöhe),
- bessere Peakerkennung bei verrauschten Signalen,
- Schultererkennung bei Peaks durch Verwendung der zweiten Ableitung oder des zweiten Grades bei Kurvenberechnungen und
- Anwenderfreundlichkeit — der neue Integrationsalgorithmus ist auf der Benutzeroberfläche über Symbolleisten und auch über Tastenkombinationen zugänglich.

Datenauswertung — Quantifizierung

Der Kalibriermodus innerhalb der Datenauswertung der ChemStation ermöglicht die gleichzeitige Darstellung von:

- einem oder mehreren Signalen, bei deren Auswertung auf das Retentionszeitfenster der aktuellen Substanz hingewiesen wurde;
- der Kalibriertabelle, deren Darstellung aus einer umfassenden Auswahl von Kalibrierparametern festgelegt werden kann und
- der Kalibrierkurve für die zu bestimmende Substanz.

Alle Fenster des Kalibriermodus' sind miteinander verbunden, so daß Veränderungen, die in einem Fenster vorgenommen werden, auf alle anderen übertragen werden. Der Modus ermöglicht die graphische Auswahl und Veränderung der Kalibrierdaten.

Die Quantifizierung erfolgt als Berechnung von %-Werten, normierten %-Werten, bezüglich externem Standard, externen Standard %, internem Standard und internen Standard % für Peakfläche oder Peakhöhe. Sie kann Mehrpunktkalibrierungen und mehrfache Definitionen eines internen Standards umfassen. Veränderungen der Kalibrierung (Histories) werden automatisch gespeichert und zur Gewichtung von Berechnungen mit Rekalibrierungen verwendet.

Weitere Informationen zur Kalibrierung und Quantifizierung finden Sie in Kapitel1 “ChemStation Konzepte” und Kapitel9 “Kalibrierung”.

Datenauswertung — Standardreports

Anwender-definierbare Reportvorlagen für die Analysenberichte sind auf dem Bildschirm Report Specification wählbar. Jede Standard Reportvorlage umfaßt standardisierte Informationsgruppen und eine Reihe optionaler Informationsgruppen.

Weitere Informationen über verfügbare Reportvorlagen finden Sie in Kapitel12 “Verwendung der ChemStation Reports”.

Datenauswertung — Spezielle Reports

Umfassendere Reportmöglichkeiten stehen in der ChemStation für Anwendungen zur Verfügung, die spezielle Reports erfordern. Sie umfassen die statistische Auswertung der Trennleistung, Trendanalysen sowie Anwender-definierbare Reportvorlagen.

Reports zur Systemeignung

Reports zur Systemeignung ermöglichen dem Anwender, die Systemleistung für einzelne Analysen zu überprüfen. Hierfür stehen drei Reportvorlagen zur Verfügung.

Der **StandardPerformance Report**druckt folgende Parameter für unkalibrierte Methoden aus:

- Retentionszeit,
- k',

- Peakfläche,
- Peakhöhe
- Symmetrie,
- Halbwertbreite der Peaks,
- Effizienz als Anzahl der theoretischen Trennstufen,
- Auflösung und
- Selektivität.

Bei Methoden mit Kalibrierungen werden die Spalten für Peakfläche, Peakhöhe und Selektivität durch den Substanznamen und Gehalt ersetzt.

Die Kopfzeile für den Report enthält die Standardkopf- und -fußzeile, die Probeninformation, die Parameter zur Trennsäule und optional eine Abbildung des Chromatogramms.

Die Reportvorlage **Performance and Noise style** fügt zum Performance Report eine Bewertung des Signalrauschens in bis zu sieben anwenderdefinierten Bereichen hinzu. Die Angabe des Rauschens erfolgt mit Signal-zu-Rausch-Verhältnissen für jeden Peak oder jede kalibrierte Komponente und einer Rauschtabelle für jedes Signal. Jede Rauschtabelle enthält Werte aus der sechsfachen Standardabweichung des Rauschens, dem Peak-zu-Peak Abstand nach ASTM-Berechnungen sowie Angaben zu Abweichungen und Drift.

Die Reportvorlage **Extended Performance** zeigt von jedem einzelnen Peak eine Darstellung, in der graphisch der Peakstart, das Peakende, die Halbwertbreiten und die Basislinie eingetragen sind. Zusätzlich werden folgende Parameter angegeben:

- Fläche, Höhe und berechnete Substanzmenge,
- Verzerrung (Skew),
- Überschuß (Excess),
- Tailingfaktor nach der USP-Methode,
- Zeitintervall zwischen den Datenpunkten und Anzahl der Datenpunkte im Peak,
- Die Statistischen Momente M0 bis M4,
- Peakbreite in halber Höhe: wahrer Wert, Berechnung mit fünf Sigma-, Tangenten- und Tailingmethode

- Anzahl theoretischer Trennböden pro Säule und pro Meter, berechnet mit der Halbwertbreite des Peaks, fünf Sigma-, Tangenten- und statistischen Methode.

Anwender können eigene Bereiche zur Berechnung der Rauschhöhe und eigene Akzeptanzkriterien angeben. Werte außerhalb des Anwender-definierten Akzeptanzbereiches werden im Report markiert.

Weitere Informationen zur Berechnung der Systemeignung entnehmen Sie bitte Kapitel13 “Ermittlung der Systemleistung”.

Zusammenfassende Reports einer Sequenz (Sequence Summary Reports)

Zusammenfassende Reports werden am Ende einer automatischen Analysensequenz erstellt. Es stehen verschiedene Möglichkeiten, von einer kurzen Zusammenfassung der gemessenen Proben bis zur genauen graphischen Auswertung von Reproduzierbarkeit oder Trendanalysen nach Benutzervorgaben zur Verfügung. Diese Reports werden aus folgenden neun Informationsquellen zusammengestellt:

- Titelseite mit Informationen nach Anwendervorgaben,
- Gerätekonfiguration mit Revisionsnummern und Angaben zur analytischen Säule für LC- und CE Systeme,
- eine Liste der Proben (Sequenz),
- ein Ausdruck des Logbuches mit Angaben zu den Proben und Dokumentationen zur Datenerfassung und -auswertung sowie unerwarteten Ereignissen,
- ein Ausdruck der analytischen Methoden,
- Reports zu den einzelnen Proben,
- Statistische Angaben zu kalibrierten Proben,
- Statistische Angaben zu den Proben unbekannten Gehaltes und
- Eine Zusammenfassung, die entweder aus einer Zusammenfassung der Proben (eine Zeile Information je Probe) oder als kurze Substanztabelle in Ergänzung der Probenzusammenfassung ausgegeben wird.

Weitere Informationen zu “Sequence Summary Reporting” entnehmen Sie bitte der Online-Hilfe und dem Abschnitt “Sequence Summary Reporting” auf Seite 256.

Report Layout

Im Menü zur Erstellung angepaßter Reports der ChemStation können Anwender den genauen Inhalt Ihrer eigenen Reports festlegen. Sie können Reportvorlagen graphisch gestalten, darin allgemeine Informationen zu den Proben, den Signalen, die Integration und die quantitativen analytischen Ergebnisse aufnehmen. Sie können eigene Gestaltungselemente wie Texte, Tabellen und Graphiken aufnehmen und die Informationen graphisch in Abschnitte gliedern sowie die Relativpositionen und Ausrichtung aller Elemente graphisch festlegen. Eigene Abschnitte können hinzugefügt, gelöscht, sortiert oder verschachtelt werden.

Anwender können eigene Kopf- und Fußzeilen für alle Seiten definieren und Datumseinträge sowie Seitenzahlen für beliebige Seiten im gewünschten Format festlegen. Informationen zur Aufnahme in den Report können alle Parameter der ChemStation oder alle Benutzer-definierten Parameter sein.

Ein Reportdesign kann mit jeder Methode verbunden werden und zum Standardformat für einen bestimmten Analysentyp werden.

Angepaßte Reports können über den Bildschirm, den Drucker oder auf eine Datei ausgegeben werden. Reports auf dem Bildschirm enthalten auch Graphiken.

Weitere Informationen zu Reportformatierungen finden Sie in der Online-Hilfe.

Control Chart Reports

In der ChemStation Software ist die Funktion "Control Chart" enthalten. Sobald diese Funktion installiert und angewählt ist, kann der Anwender beim Ausführen der Methode automatisch einen bestimmten Substanzparameter verfolgen. Als Parameter kommen dabei in Frage: Menge, Responsefaktor, Retentionszeit und Fläche.

Weitere Informationen zu den Control Chart Reports finden Sie in der Online-Hilfe.

Möglichkeiten und Kompatibilitäten

Allgemein

Die ChemStation kann Datendateien in das ANDI (Analytical Data Interchange) Chromatographieformat der Analytical Instrument Association (AIA), Version 1.0, Copyright 1992 importieren und daraus exportieren. Der Datenimport wird durch den Compliance-Level eins (Probeninformation und

Signaldaten) unterstützt und der Datenexport duch den Compliance-Level zwei (Probeninformation, Signaldaten und Intgrationsergebnisse).

Die ChemStation enthält Befehle und Funktionen, mit denen der dynamische Datenaustausch (DDE) auf der Ebene von Microsoft Windows sowohl als DDE-Empfänger als auch als DDE-Verteiler durchgeführt werden kann. Die Befehlsreihe enthält Befehle zum Verbinden und Trennen, zum beidseitigen Austausch von Informationen sowie zum ferngesteuerten Ausführen von Funktionen.

Die ChemStation enthält Befehle und Funktionen, mit denen der Open Database Connectivity (ODBC) Standard von Microsoft genützt werden kann. Der ODBC Standard wird über den Erweiterungslevel eins unterstützt. Weitere Informationen befinden sich in den Spezifikationen für das Produkt Agilent ChemStore.

ChemStations für LC und CE

Methoden, Datendateien, Spektrenbibliotheken und Sequenzen aus früheren Versionen der ChemStations für LC, einschließlich der Versionen A.01.00 bis A.04.02, sind mit der ChemStation Software kompatibel.

Die ChemStation-Software enthält Möglichkeiten zur Umwandlung von Dateien mit Flüssigkeitschromatographiedaten und Spektrenbibliotheken für die LC ChemStation (Pascal Series). Diese können auch automatisch durch das Anwenden von Makros (siehe den Abschnitt “Weitgehende Anpassung”) ablaufen, um Chromatographiedaten in das neue ChemStation Format für LC umzuwandeln. Beachten Sie jedoch, daß die Umwandlungsroutine nur von Windows 95 untersützt wird.

Der Datentransfer zwischen der Pascal- und der DOS-Umgebung kann über 3.5-Zoll Disketten, serielle Verbindungen oder lokale Netzwerke durchgeführt werden.

HP 3365 ChemStations

Methoden, Datendateien und Sequenzen aus der Reihe der HP 3365 ChemStation (DOS Series) müssen über geeignete, in der ChemStation installierte Importfunktionen umgewandelt werden. Nach der Umwandlung sind sowohl die Methoden als auch die Datendateien mit der ChemStation kompatibel. Importierte Sequenzen können lediglich zum wiederholten Berechnen der Datendateien verwendet werden.

Weitgehende Anpassung

Die ChemStation kann mit Hilfe des umfangreichen Befehlssatzes angepasst werden. Die enthaltenen Befehle können zu automatischen Funktionen kombiniert werden. Eine solche Kombination von Befehlen heißt Makro. Anwender können zur Erstellung von Makros eigene Variablen definieren, Verzweigungen und Schleifen sowie Ein-/Ausgabeoperationen festlegen. Diese umfassen Dateioperationen, Interaktionen mit dem Anwender, eigene verschachtelte Makros und Datenabgleich und Austausch mit anderen MS-DOS oder Windows-Anwendungen.

Für weitere Informationen zur weitgehenden Anpassung schlagen Sie bitte im *Macro Programming Guide nach*, der über die Online-Hilfe verfügbar ist.

Die ChemStation unterstützt das Microsoft ODBC-Protokoll mit Befehlen, um Verbindungen zu Datenbanken herzustellen und wieder zu trennen, den Status einer bestimmten Verbindung abzulesen und die Structured Query Language (SQL) auszuführen.

Automatisierung

Die ChemStation kann Sequenzen ausführen, die mehrere Methoden beinhalten.

Im Parametersatz einer Sequenz kann die Verwendung automatisch erzeugter Dateien oder von sequentiell numerierten Dateien mit einem Prefix nach Benutzervorgaben von 7 Zeichen Länge eingestellt werden. Der Anwender kann vollständige Sequenzen wählen oder solche, die nur die Datenauswertung durchführen. Weiter kann unter mehreren Abschlußbefehlen oder einem Anwender-definierten Abschlußmakro gewählt werden, das dann ausgeführt wird, wenn eine Sequenz durch eine Fehlerbedingung beendet wird oder alle Analysen durchgeführt wurden.

Die Sequenztabelle mit den auszuführenden Analysen wird ähnlich einer Tabellenkalkulation bedient. Hier können die Nummern von Probenfläschchen, Probennamen, Analysenmethoden, Parameter zur quantitativen Auswertung mit Angaben zur gefundenen Menge, ein Multiplikations- oder Verdünnungsfaktor, Angaben zur Kalibrierung sowie die Zahl der Injektionswiederholungen festgelegt werden. Es ist möglich, zwischen den Zellen der Tabelle zu springen und dabei deren Inhalte oder ganze Reihen oder mehrere ganze Reihen zu kopieren, auszuschneiden oder einzusetzen. Damit können Sequenzen leicht und schnell erstellt werden.

Proben können in der Sequenztabelle als Unbekannte, Standard oder Kontrolle festgelegt werden. Der Probentyp bestimmt, ob die Probe einer speziellen Datenauswertung unterzogen wird:

- unbekannte Proben werden entsprechend der Methodenspezifikationen ausgewertet und als Report abgelegt;
- Standards werden dazu verwendet, die Substanzen zur Quantifizierung der Methode wie unten beschrieben neu zu kalibrieren;
- Kontrollen werden bezogen auf den in der Methode festgelegten Grenzwert für eine Substanz ausgewertet. Wenn das Ergebnis außerhalb eines bestimmten Bereiches liegt, wird die Sequenz angehalten.

Kalibrierungsstandards können als einfach, zyklisch oder umschließend definiert werden. Einfache Rekalibrierung bedeutet, daß eine Rekalibrierung immer dann durchgeführt wird, wenn ein Kalibrierungsstandard in der Sequenz vorkommt. Zyklische Rekalibrierungen werden während einer Analysenserie in festgelegten Intervallen durchgeführt. Bei der umschließenden Rekalibrierung wird je ein Standard vor und einer nach einer Reihe unbekannter Proben gemessen. Zur quantitativen Auswertung der unbekannten Proben wird eine Kalibriertabelle aus den Mittelwerten der beiden Kalibrierungen verwendet.

Die Funktion für Teilsequenzen erlaubt einen Einblick in die Reihenfolge der Sequenzbearbeitung und stellt eine Wiederholungsmöglichkeit zur Vermessung oder Nachbearbeitung einzelner Proben zur Verfügung. Bei der wiederholten Auswertung kann für die Quantifizierung zwischen den Originaldaten oder neuen Einträgen der Probentabelle gewählt werden.

Sequenzen können zur schnellen Vermessung von Vorzugsproben unterbrochen werden. Danach kann die Sequenz ohne eine Beeinflussung des automatischen Ablaufs fortgesetzt werden. Proben können zu einer Sequenztabelle hinzugefügt werden, während die Sequenz bearbeitet wird.

Sowohl die Sequenz als auch die Teilsequenz können ausgedruckt werden.

Weitere Informationen zu Sequenzen entnehmen Sie bitte Kapitel10 “Automatisierung” und dem Online-Hilfesystem.

Gute Laborpraxis (Good Laboratory Practice, GLP)

Die ChemStation wurde gemäß internationaler Konzeptions- und Design-Richtlinien entwickelt und verfügt über eine Reihe von Merkmalen, die den Betrieb unter behördlicher Kontrolle erleichtern. Diese Merkmale beziehen sich auf die umfassende Spezifikation und Überprüfung von

Methoden hinsichtlich ihrer Eignung für ein Meßvorhaben, auf die Funktionskontrolle im System und stellen die Nachvollziehbarkeit, Herkunft und Qualität der Daten sicher.

Entwicklungsprozeß

- Ein Zertifikat zur Validierung wird mit jedem Softwarepaket geliefert und dokumentiert die Schritte der Softwareentwicklung und Erprobung als Teil des Entwicklungsprozesses. Der Entwicklungsprozeß entspricht der Qualitätsnorm ISO 9001. Er ist zusammen mit den Protokollen zur Revalidierung im *Validation Binder der ChemStation für LC dokumentiert*.

Spezifikation und Anwendung von Methoden

- Globale Methoden — alle Spezifikationen für Analysengeräte und zur Datenauswertung werden an einem Ort gespeichert. Methoden beinhalten Spezifikationen des Mengenbereiches von Komponenten. Hierdurch wird sichergestellt, daß Mengenangaben nicht außerhalb des Kalibrierungsbereiches erfolgen.
- Das Logbuch über Änderungen der Methode (History) ermöglicht es den Anwendern einer validierten Methode, automatisch zu dokumentieren wie und wann die Methode verändert wurde. Anwender können optional eine Begründung für die Veränderung der Methode mit ins History-Logbuch eintragen. Das History-Logbuch wird automatisch als Teil der Methode im Binärformat abgelegt. Um einen unerlaubten Eingriff in die Dokumentationen zu verhindern, wird es entsprechend des Schemas zur Anmeldung eines Anwenders, wie unten beschrieben, geschützt. Jede Veränderung im History-Logbuch kann auf dem Bildschirm angesehen und ausgedruckt werden.
- In jeder Methode können für eine Reihe von Chromatographie- und Geräteleistungsparametern Grenzwerte auf der Basis von einzelnen Substanzen festgelegt werden. Eine genauere Beschreibung hierzu befindet sich im Abschnitt “Datenauswertung - Quantifizierung”. Ergebnisse, die diese Parameterbereiche überschreiten, werden dazu verwendet, die Durchführung automatischer Sequenzen,wie unter “Automatisierung” beschrieben, zu kontrollieren. Sie werden auf dem entsprechenden Analysenreport vermerkt.
- Reports zur Systemeignung und Systemleistung (siehe den Abschnitt zur Reporterstellung oben) liefern genaue Daten zur Trennleistung.

Die ChemStation kann mit Zugangsbeschränkungen auf zwei Ebenen, einer Bediener- und einer Managerebene konfiguriert werden. Die Manager-Ebene kann durch ein Passwort geschützt werden und ermöglicht den Zugriff auf alle Funktionen der ChemStation. Die Bedienerebene ist auf die Nutzung einer Grundfunktionalität und die Ausführung definierter analytischer Methoden beschränkt. Die Bedienerebene ist zum Einsatz in Routinelabors gedacht und hindert Bediener insbesondere daran, Methoden zu verändern oder neu zu erstellen.

Stabilität von Methoden

- Zusammenfassende Reports von Sequenzen (vgl. “Datenauswertung — Spezielle Reports” auf Seite 23) bieten die Möglichkeit, Methoden auf Stabilität zu testen. Erweiterte Reportformate mit Anwender-definierbaren Kriterien werden als Trendgraphiken ausgegeben und können zur Beurteilung der realistischen Betriebsgrenzen dienen. Die Betriebsgrenzen können in eine Methode aufgenommen werden, wodurch zusammen mit Kontrollproben sichergestellt wird, daß die Methode innerhalb dieser Grenzen arbeitet.

Systembetrieb

- Das Verification Kit der ChemStation ist ein Teil der Standardsoftware und überprüft automatisch auf korrekte Installation und Funktion der Datenauswertung der Software, indem bekannte Ergebnisse mit einer Testauswertung verglichen werden. Das Verification Kit ermöglicht die Definition eigener Datensätze und Methoden zur Durchführung des Tests.

Nachvollziehbarkeit, Herkunft und Qualität der Daten

Das Logbuch liefert ein Protokoll über das komplette System. Es speichert alle unerwarteten Ereignisse (Fehler, Parameterveränderungen während der Analyse) sowie die Gerätebedingungen vor und nach jeder Analyse. Eine Kopie des relevanten Logbuchauszuges wird mit jedem Datensatz gespeichert.

Die aktuellen Gerätebedingungen, wie zum Beispiel Druck, Flußrate und Temperatur während einer Analyse werden ebenfalls gespeichert, falls das entsprechende Gerät diese Möglichkeit bietet. Diese Daten können später mit dem Chromatogramm graphisch dargestellt werden, um den Gerätezustand während dieser Analyse zu zeigen und in den Report aufzunehmen.

Mit den Datensätzen werden Kopien der verwendeten Methode gespeichert, womit eine vollständige Reproduzierbarkeit der Daten zu einem späteren

Zeitpunkt möglich ist. Die Methode wird nach Abschluß aller analytischer Schritte gespeichert.

Alle Reports tragen Datumseinträge und eine nachvollziehbare Seitennummerierung (*Seite x von y*). Der Anwender kann einen Reportumfang von einer einfachen Zusammenfassung bis zur Darstellung aller Gerätedetails wählen (vgl. Abschnitt zu Reports oben).

GLP Registerdateien, die als Teil einer Methode definiert werden, sichern alle Originaldaten mit Probeninformation, die Datenauswertemethode, die chromatographischen Meßwerte, die Geräteeinstellungen, die Ergebnisse aus Integration und Quantifizierung, die Daten des Reports und das Logbuch des Analysenlaufes in einer binären Registerdatei mit einem Prüfsummenschutz. Dieses Binärformat kann nicht editiert werden und sichert daher die Originalität der Ergebnisse.Die Datei enthält ein Revisionsschema, welches anzeigt, wenn die Daten erneut bearbeitet werden.

In der Sequenztabelle können Kontrollen definiert und dazu verwendet werden, die Leistungsfähigkeit des Gerätes über einen Vergleich zu den Ergebnissen der Kontrollproben automatisch zu überprüfen, wenn das Gerät unbeobachtet läuft. Ergebnisse, die außerhalb eines vom Anwender festgelegten Akzeptanzbereiches liegen, führen zum Abruch der automatischen Abarbeitung von Sequenzen durch das Gerät.

Gerätesteuerung

Die Möglichkeiten der Gerätesteuerung mit der ChemStation können durch den Erwerb zusätzlicher Gerätemodule zu einer Mehrgeräte- Konfiguration erweitert werden. Weitere Informationen finden Sie in den Gerätehandbüchern der zusätzlichen ChemStation Module.

Einsatz von Netzwerken

Die ChemStation wurde erfolgreich auf die Kompatibilität mit der LanManager Software, der Novell NetWare sowie Microsoft Windows 95 und Microsoft Windows NT-Produkten, die auf IEEE 802.3 CSMA/CD Spezifikationen basieren, getestet. Sie sollte mit jeder Netzwerk-Software kompatibel sein, die dem Programmierstandard von Microsoft Windows entspricht.

Diese Produkte ermöglichen es der ChemStation physikalisch vorhandene Geräte, wie Plotter und Drucker und Informationen, wie Daten- oder Methodendateien mit anderen Laboratorien und deren Computern zu teilen.

Client/Server

Die ChemStation Software kann auf einem geeigneten Netzwerkserver installiert und nach Bedarf auf einen damit verbundenen PC geladen werden. Die spezielle Konfigurierung jedes angebundenen PCs gewährleistet eine angemessene Umgebung für verschiedenen Techniken und einzelne Anwender. Die zentralisierte Installation der Software löst das Problem, viele Kopien derselben ChemStation innerhalb einer Abteilung zu verwalten.

Gerätesteuerung über LAN

Die ChemStation Software ermöglicht die Gerätesteuerung über LAN und die Datenaufnahme für Agilent 6890 Gaschromatographen, Agilent 35900E A/D Steuermodule und Flüssigkeitschromatographen der Agilent 1100 Serie. Geräte können leicht eingebunden werden, indem man sie an ein LAN anschließt, an dem auch der ChemStation PC angeschlossen ist. Diese Anordnung ermöglicht es, den ChemStation PC von den Geräten, die er ansteuert örtlich zu trennnen.

Dokumentation

Die Dokumentation enthält bestimmte Abschnitte über:

- die Installation und das Erlernen der ChemStation Software,
- das Anwenden der ChemStation Software,
- das Verstehen der Arbeitsprinzipien der Software und
- die Anpassung der ChemStation.

Installation und Erlernen

Jede ChemStation Software wird mit einem Installationshandbuch geliefert, das Details über die wichtigsten Punkte der PC Hardware- und Softwareanforderungen, den Einbau der Schnittstelle, die Installation der ChemStation und die Voraussetzungen für die Installation enthält. Das Installationshandbuch ist spezifisch für die gekaufte Konfiguration und kann Anweisungen zu Troubleshooting, Systemdokumentationen und Instandhaltung des Systems beinhalten.

Jede ChemStation enthält ein aufgabenorientiertes Tutorial, das in die Software integriert werden kann. Das Tutorial ist in erster Linie eine Lernhilfe und so ausgelegt, daß der Anwender selbständig die notwendigen Anwendungen erlernen kann. Jede analytische Aufgabe ist in eine Anzahl leicht verständlicher Schritte unterteilt, die der Anwender automatsch von der Software ausführen lassen und anschließend selbst üben kann.

Anwenden der Software

Zwei zusätzliche Kategorien von Online-Informationen wurden für den Routineanwender entworfen.

Die ChemStation enthält eine verständliche, an den Kontext anlehnende, katalogisierte Online-Hilfe im Windowsformat. Sie liefert zu jeder Bildschirmdarstellung und zur Bedeutung der wichtigsten darauf enthaltenen Parameter detaillierte Erklärungen. Die Erklärungen werden, wenn nötig, durch Graphiken ergänzt und können in die Windows-Zwischenablage kopiert werden. Von dort können sie in Anwenderdokumentationen eingebunden oder ausgedruckt werden.

Der Abschnitt “How to” (Wie man ...) der Online-Hilfe enthält Checklisten über die technikorientierten und die chromatographischen Aufgaben. Sie

helfen dem weniger routinierten Anwender, das System richtig einzurichten. Diese Checklisten sind direkt mit den detaillierten Informationen der Online-Hilfe verbunden.

Verstehehen der Prinzipien

Das Handbuch *ChemStation*-Konzepte dokumentiert die Prinzipien der Software-Bedienung und die Algorithmen bei der Datenbearbeitung.

Anpassung

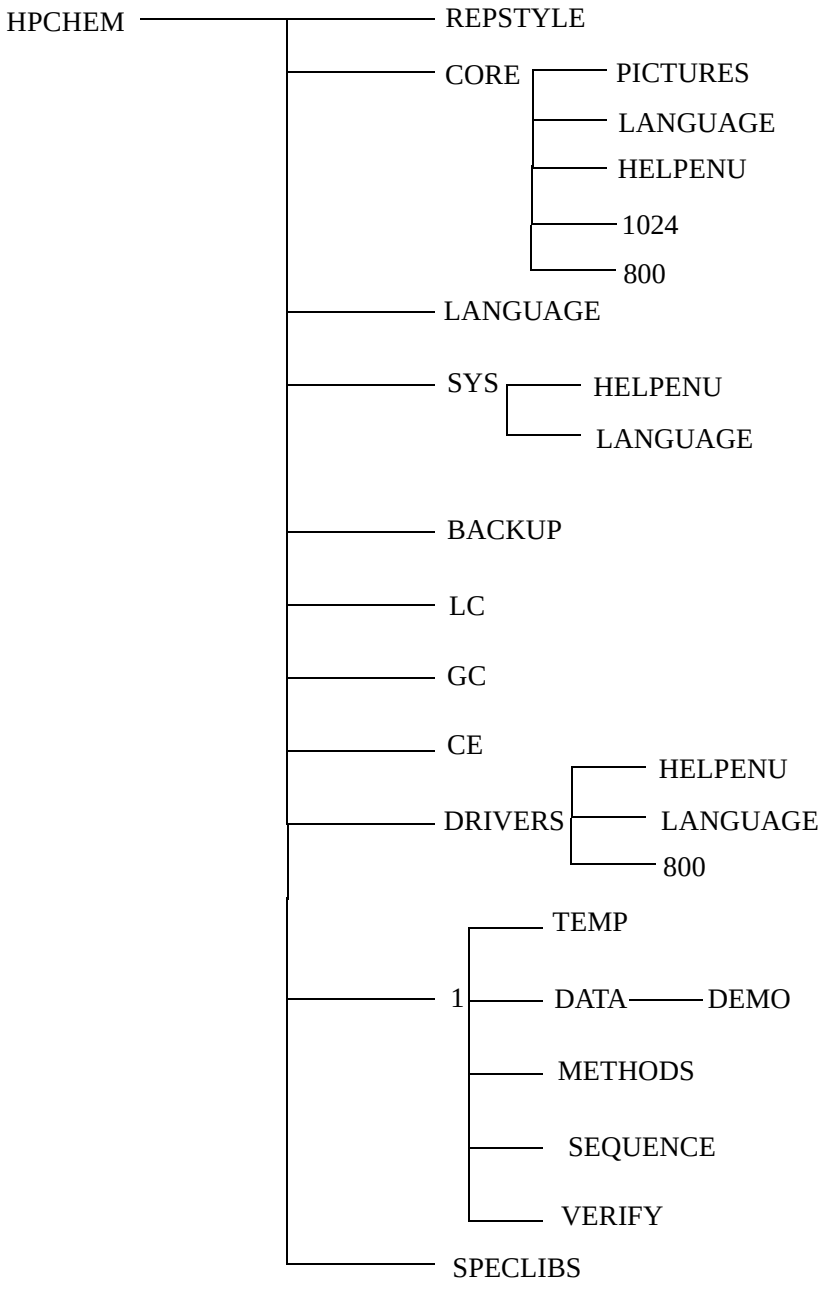
Erfahrene Anwender, die die Bedienungsweise der ChemStation an ihre Bedürfnisse anpassen oder zusätliche Möglichkeiten einbauen wollen, können dies durch Schreiben von Makros erreichen.

Das erste Referenzhandbuch, *Macro Programming Guide* , das über die Online-Hilfe verfügbar ist, enthält leicht verständliche Beispiele, die durch die vollständige Beschreibung der internen Datenarten und Strukturen ergänzt sind.

Die Hilfedatei zu den Befehlen dient dem Programmierer als Arbeitsreferenz und ist direkt über das Hilfemenü der ChemStation oder über das Dialogfeld “Show Command” zugänglich. Sie enthält Erklärungen zu Syntax und den Parametern mit Beispielmakros, die den Einsatz vieler der Befehle erläutern. Dadurch, daß sie sich online befinden, kann der Anwender ganze Beispiele oder nur eine Befehlssyntax direkt in das eigene Makro kopieren.

Die Verzeichnisstruktur der ChemStation

Die Verzeichnisstruktur der ChemStation wird im Folgenden als Beispiel gezeigt. Sie besteht aus allgemeinen Verzeichnissen, die von allen angeschlossenen Analysengeräten benutzt werden sowie aus gerätespezifischen Verzeichnissen. Das Installationsprogramm legt ein Unterverzeichnis des Verzeichnisses der ChemStation (Standardname: HPCHEM) für jedes angeschlossene Analysengerät mit dessen Gerätenummer an. In diesem Verzeichnis werden standardmäßig alle Daten, Methoden und Sequenzen für dieses Analysengerät gespeichert.


HPCHEM
REPSTYLE
CORE
PICTURES
LANGUAGE
HELPENU
1024
800
LANGUAGE
SYS
HELPENU
LANGUAGE
BACKUP
LC
GC
CE
DRIVERS
HELPENU
LANGUAGE
800
1
TEMP
DATA
DEMO
METHODS
SEQUENCE
VERIFY
SPECLIBS

Folgende sind die Unterverzeichnisse der ChemStation:

Verzeichnis	Inhalte
HPCHEM	In diesem Verzeichnis stehen alle Programme zum Konfigurieren und Starten der ChemStation. Es muß in der Umgebungsvariable PATH enthalten sein. Dieses Verzeichnis wird vom Installationsprogramm automatisch angelegt, außer wenn eine Alternative eingegeben wird.
REPSTYLE	Hier befinden sich alle Reportvorlagen, die mit dem Reportdesigner definiert wurden.
CORE	Hier befinden sich die Basiskomponenten der Software, die von allen chromatographischen Geräten benutzt werden. Es ist auch das Arbeitsverzeichnis der ChemStation.
PICTURES	Die für die ChemStation erforderlichen Graphiken befinden sich in diesem Verzeichnis.
LANGUAGE	Hier befinden sich spezifische Sprachmodule dieses Teils der Software.
1024 and 800	Hier befinden sich Intitialisierungsdateien für die Softwareschnittstelle für Anwender. Diese nicht ändern!
SYS	Hier befinden sich die allgemeinen Komponenten, die von allen chromatographischen Gerätemodulen genutzt werden. \hpchem\sys muß in der Umgebungsvariablen PATH enthalten sein. Das Installationsprogramm fügt es standardmäßig hinzu.
HELPENU	Hier befindet sich die US-Englische Version der Hilfedateien für die passenden Teile der Software.
LANGUAGE	Hier werden andere Sprachen-spezifische Teile der Software gespeichert.
BACKUP	Hier werden während der Installation Sicherungskopien alter Dateien abgelegt.
DRIVERS	Hier befinden sich die Gerätetreiber der konfigurierten Analysengeräte.
1	Verwendung für das jeweilige Gerät (1 bis 4). Dieses Verzeichnis enthält fünf weitere Unterverzeichnisse: DATA, METHODS, SEQUENCE, VERIFY und TEMP.

DATA	Hier stehen alle Verzeichnisse mit den Analysenergebnissen. Es können noch weitere Unterverzeichnisse enthalten sein, deren Definition im Dialogfeld Sample Information oder Sequence Parameters möglich ist. Unterverzeichnisse mit Ergebnissen tragen die Dateinamenerweiterung .D. Zu weiteren Informationen zur Struktur von Datensätzen siehe “Datensätze” auf Seite 60.
METHODS	Hier stehen alle Methodenverzeichnisse mit der Dateinamenerweiterung .M. Zu weiteren Informationen siehe “Verzeichnisstruktur von Methoden” auf Seite 50.
SEQUENCE	Hier stehen die Sequenztabellen. Die Sequenzdateien tragen die Dateinamenerweiterung .S.
VERIFY	Hier stehen Datensätze, Methoden und Ergebnisse der Datenbearbeitung in Registerdateien (.REG). Diese Dateien führen die Prüfroutinen aus, die in der Online-Hilfe beschrieben werden. Ein Satz, bestehend aus Daten, Methode und Registerdatei wird für jeden Überprüfungstest benötigt
TEMP	Das Unterverzeichnis TEMP enthält temporäre Arbeitsdateien und Logbuchdateien. Zum Beispiel wird bei Gerät 1 das Online-Logbuch INSTR1.LOG und das Offline-Logbuch INSTR1-2.LOG genannt.
LC, GC, CE	Hier befinden sich Dateien, die für die Gerätetreiber erforderlich sind, zum Beispiel die Initialisierungsdatei INI. Diese Verzeichnisse sind nur vorhanden, wenn die entsprechenden Geräte vorhanden sind.
SPECLIBS	Hier stehen alle Spektrenbibliotheken. (nur für ChemStations mit 3D LC Systemen, LC/MS Systemen und CE Systemen).

2

Methoden

Methoden

In diesem Kapitel werden folgende Themen behandelt:

- Was ist eine Methode?
- Die Bestandteile einer Methode
- Der Status von Methoden
- Erstellen von Methoden
- Editieren von Methoden
- Die Verzeichnisstruktur von Methoden
- Was geschieht während der Ausführung einer Methode?

Was ist eine Methode?

Eine Methode besteht aus allen erforderlichen Parametern zur Datenerfassung und Datenauswertung, und gegebenenfalls aus den Aktionen vor und nach der Messung (Pre- und Post-Run Tasks) für bestimmte Proben.

Die Bestandteile einer Methode

Eine Methode trägt einen Namen, der aus bis zu acht alphanumerischen Zeichen bestehen kann. An der Dateinamenerweiterung .M kann man stets erkennen, daß es sich um eine Methode handelt. Methoden werden als MS-DOS Verzeichnisse gespeichert und enthalten bestimmte Dateien für die einzelnen Teile einer Methode.

Jede Methode besteht aus fünf Komponenten:

- Methodeninformation,
- Steuerung der Analysengeräte ,
- Datenauswertung und
- Checkliste zur Ausführung

Methodeninformation

In diesem Abschnitt werden Informationen zur Methode gespeichert.

Die Steuerung der Analysengeräte

Hier werden Parameter zur Steuerung von Analysengeräten oder deren Komponenten definiert. Bei LC-Geräten dienen Angaben, wie Zusammensetzung der mobilen Phase, Flußrate, Injektionsvolumen, Wellenlänge des Detektors etc. zur Steuerung von Pumpe, Probengeber und Detektor. Bei GC-Geräten steuern die Angaben zur Einlaßtemperatur, Einlaßdruck, Flußrate auf gepackter Säule etc. das Analysengerät.

Datenauswertung

Hier werden Parameter zur Durchführung der Datenauswertung definiert.

Signaldetails

Hier werden Signale und ihre Eigenschaften für die Datenauswertung definiert.

Integration Events (Integrationsparameter)

Hier werden zeitabhängige Parameter definiert, die innerhalb eines Chromatogrammes oder Elektropherogrammes zu einer bestimmten Retentions- bzw. Migrationszeit auftreten. Über die zeitabhängigen Parameter kann die Art der Integration geändert werden.

Peak Identification (Peakerkennung)

Hier werden Parameter definiert, die zur Peakerkennung in Chromatogrammen oder Elektropherogrammen dienen.

Peak Quantification (Mengenbestimmung)

Hier werden Parameter zur Konzentrations- oder Mengenberechnung eines Peaks definiert.

Calibration and Recalibration (Kalibrierung und Rekalibrierung)

Hier werden Parameter für die Kalibrierung definiert, die festlegen, wie oft eine Kalibrierung ausgeführt wird.

Report

Hier wird das Format des Reports festgelegt, der nach einem Analysenlauf gedruckt wird.

Run-Time Checklist (Checkliste zum Analysenlauf)

Hier wird definiert, welcher Teil einer laufenden Methode ausgeführt wird.

Sie können die Checkliste zum Analysenlauf für folgende Funktionen verwenden:

- zum Erfassen, Speichern und Bearbeiten von Daten bis zur Reporterstellung,
- zum Ausführen von nur einem Methodenteil,
- zum Erfassen und Speichern von Daten ohne Bearbeitung,
- zum erneuten Nachbearbeiten von Datensätzen,
- zum Einsatz eigener Makros zur Datenanalyse und Aktionen vor und nach dem Analysenlauf (Pre- und Postrun Processing) und
- zum Ablegen der Analysenergebnisse in Registern für GLP-Zwecke .

Der Status von Methoden

Eine Methode kann auf zwei Arten vorliegen.

Gespeicherte Methode (Stored Method)

Dies ist eine Methode, die auf der Festplatte des Computers gespeichert ist. Gespeicherte Methoden haben einen Namen aus bis zu acht alphanumerischen Zeichen gefolgt von der Dateinamenerweiterung .M.

Aktuelle Methode (Current Method)

Wenn eine gespeicherte Methode von der Festplatte aufgerufen wird, ist sie die aktuelle Methode. Im Speicher existiert immer eine aktuelle Methode. Beim ersten Start der ChemStation wird die von Agilent Technologies gelieferte Standardmethode als Teil des Startprozesses geladen. Es könnte eine der folgenden Methoden sein:

- DEF_LC.M bei einem LC-Gerät,
- DEF_GC.M bei einem GC-Gerät oder
- DEF_CE.M bei einem CE-Gerät.

Eine Kopie der Standardmethode wird im Hauptspeicher abgelegt und wird zur aktuellen Methode. Sie können an dieser Stelle eine andere Methode laden, die dann zur aktuellen Methode wird. Die oben aufgeführten Methoden verwenden den neuen Integrationsalgorithmus. Wenn Sie den Standardintegrationsalgorithmus verwenden wollen, müssen Sie Ihre Methode aus eine der folgenden Methoden aufbauen:

- DEFOLDLC.M für einen Flüssigkeitschromatographen,
- DEFOLDGC.M für einen GC oder
- DEFOLDCE.M für eine CE.

Erstellen von Methoden

Das Erstellen einer neuen Methode läuft immer über Abändern der aktuellen Methode und anschließende Speicherung der Modifikation unter einem neuen Methodennamen. Beachten sie, daß nach der Änderung einer Methode die Version auf der Festplatte unverändert bleibt, bis die Änderungen gespeichert werden.

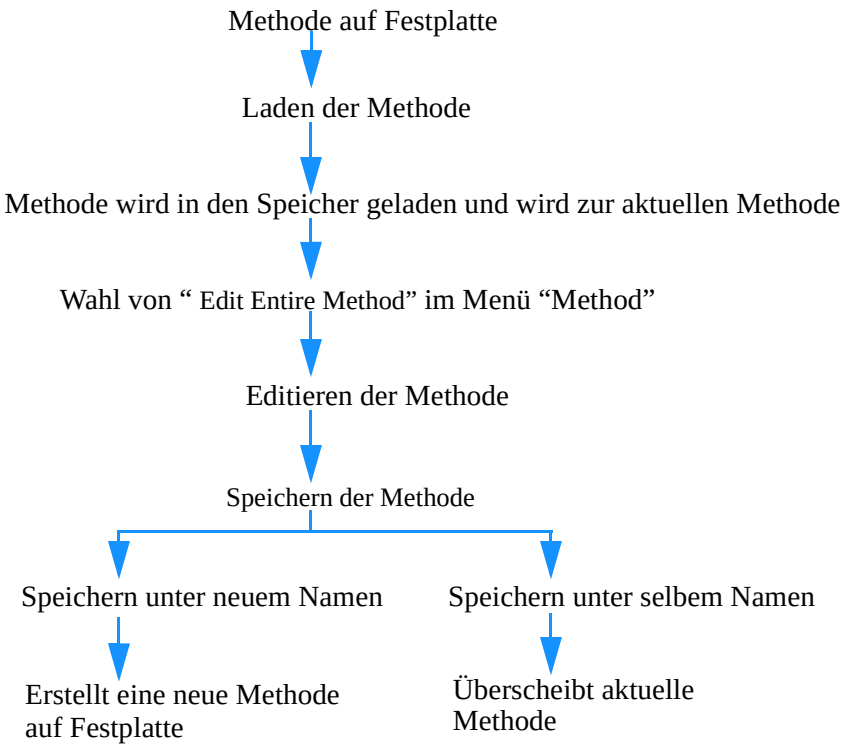
Die Art der Methodenerstellung ist frei wählbar. Sie können eine Methode erstellen, die entweder einen oder alle Teile einer Analyse steuert. Sie können also eine Methode zum Beispiel nur für die Datenerfassung erstellen. Für die Datenauswertung mit Report zur Bibliothekssuche von Spektren können Sie die Methode dann um diese Aufgaben erweitern.

VORSICHT

Löschen Sie nicht die Standardmethoden DEF_LC.M, DEF_CE.M oder DEF_GC.M. Diese Methoden dienen bei der Erstellung neuer Methoden als Vorlagen.

Editieren von Methoden

Sie können eine existierende Methode editieren, indem Sie den Menüpunkt Edit Entire Method im Menü Method aufrufen. Sie werden durch alle Dialogfelder geführt und schließlich kann die Methode gespeichert werden. Dieser Ablauf wird unten verdeutlicht:


Methode auf Festplatte
Laden der Methode
Methode wird in den Speicher geladen und wird zur aktuellen Methode
Wahl von “ Edit Entire Method” im Menü “Method”
Editieren der Methode
Speichern der Methode
Speichern unter neuem Namen
Speichern unter selbem Namen
Erstellt eine neue Methode auf Festplatte
Überscheibt aktuelle Methode

Editierbare Methodenteile

Jede Methode besteht aus fünf Komponenten, die separat editierbar sind:

Es folgen nun Abschnitte, die sich auf bestimmte Dialogfelder beziehen sowie allgemeine Beschreibungen.

- *die Methodeninformation* besteht aus:

Text zur Beschreibung einer Methode

- *die Gerätesteuerung* ist von der Konfiguration abhängig und kann beispielsweise Folgendes enthalten:

  Ofenparameter

  Parameter des automatischen Probengebers

  Detektorparameter

- *die Datenauswertung* besteht aus:

  Signaldetails,

  Integrationsparametern

  Parametern zur Quantifizierung

  Parametern zur Kalibrierung

  Parametern zur Reporterstellung

- *die Checkliste zur Ausführung eines Analysenlaufes* besteht aus:

  den Teilen der Methode, die ausgeführt werden.

Verzeichnisstruktur von Methoden

Eine Methode besteht aus einer Gruppe von Dateien, die im Methodenverzeichnis gespeichert werden.

Im Verzeichnis METHODS stehen alle Methoden. Sie besitzen die Dateinamenerweiterung .M.

Methodendateien mit der Erweiterung .MTH enthalten die Parametersätze und liegen im ASCII -Format vor. Die Datei INFO.MTH faßt die Kontrollparameter der Methode zusammen.

Methodendateien mit Parametern zur Gerätesteuerung tragen den Namen des zugehörigen Analysengerätes. Einige Beispiele:

LC1090.MTH	Datenerfassungsmethode des HP 1090
GC5890.MTH	Datenerfassungsmethode des HP 5890
HPCE1.MTH	Datenerfassungsmethode der Agilent Kapillarelektrophorese
DAD1.MTH	Datenerfassungsmethode des HP 1090, HP 1050 oder HP 1040 Dioden-Array-Detektors.
FLD1.MTH	Datenerfassungsmethode des HP 1046 Fluoreszenzdetektors.
ECD1.MTH	Datenerfassungsmethode des Agilent 1049 Elektrochemischen Detektors.
ADC1.MTH	Datenerfassungsmethode des Agilent 35900. Wenn zwei identische Module angeschlossen sind, heißen die Methoden ADC1.MTH, ADC2.MTH.
1050VWD	Datenerfassungsmethode von Modulen der Serie HP 1050. Das Modul wird in den letzten drei Buchstaben beschrieben, wie hier z.B. der Variable Wellenlängendetektor.
DAMETHOD.REG	für die Datenauswertung.
LALS1.REG	Parameter für die automatischen Probengeber der Agilent 1100 Serie. Die Methodendatei für andere Module der Agilent 1100 Series folgt derselben Regel lxxx1.reg, wobei xxx dem Initialwort für das Modul entspricht.

Was geschieht während der Ausführung einer Methode?

Die Checkliste zur Ausführung legt in einem Dialogfeld fest, welcher Teil einer Methode in einem Analysenlauf ausgeführt wird.

Die Checkliste zur Ausführung besteht aus acht Teilen:

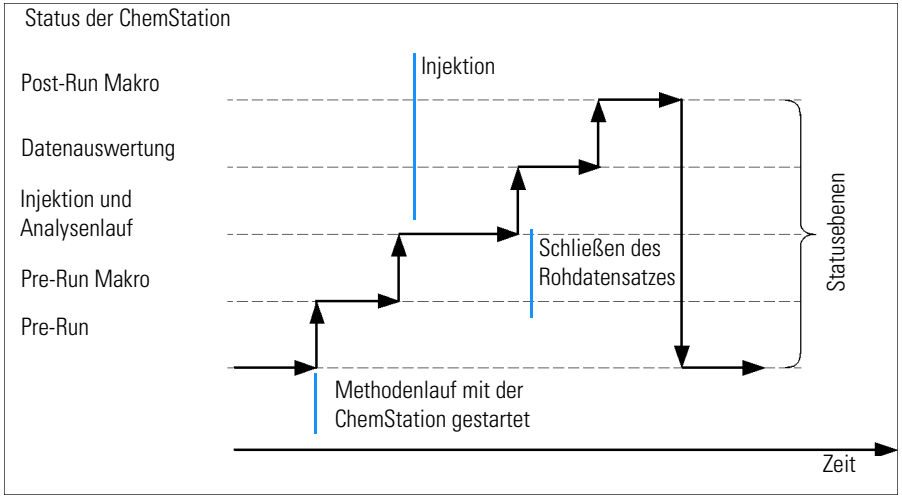
- Befehl oder Makro vor dem Analysenlauf (Pre-Run)
- Datenerfassung
- Standard Datenauswertung
- Auswertemethode des zweiten Datensignals (nur bei GC-Geräten)
- Angepaßte Datenauswertung
- Speicherung von GLP-Daten
- Befehl oder Makro nach dem Analysenlauf (Post-Run)
- Speicherung einer Kopie der Methode mit Daten

Bei der Ausführung einer Methode werden die im Dialogfeld „RunTime Checklist" spezifizierten Teile ausgeführt.

Ablauf einer Methode

Abbildung 1 vermittelt einen Überblick über den Status der ChemStation während des Ablaufes einer Methode, wenn *alle* Bestandteile der Checkliste zur Ausführung gewählt wurden.

Abbildung 1 **Methodenablauf**



Befehl oder Makro vor dem Analysenlauf (Pre-Run)

Wenn ein Makro oder ein Befehl zur Ausführung vor dem Analysenlauf angegeben wird, erfolgt die Ausführung vor dem Start der Analyse. Dieser Teil dient normalerweise der Systemanpassung in Verbindung mit anderen Softwarepaketen.

Datenerfassung

- Alle Parameter werden auf die Anfangsbedingungen gesetzt, die in der aktuellen Methode angegeben sind.
- Wenn angegeben, wird ein Injektionsprogramm ausgeführt und eine Injektion erfolgt aus dem aktuell definierten Probenfläschchen.
- Auf dem Bildschirm wird der Verlauf der Analyse, zusammen mit chromatographischen oder elektrophoretischen Informationen sowie gegebenenfalls den Spektren dargestellt.
- Daten werden erfaßt und in einer Datei gespeichert.

Datenauswertung

Bei Erreichen der Stopzeit wird der Analysenlauf beendet und die Rohdaten werden auf der Festplatte des Computers gespeichert. Der Softwareteil zur Datenauswertung startet nach dem Speichern der Rohdaten.

Integration

- Chromatographische/elektrophoretische Objekte im Signal werden so integriert wie im Dialogfeld „Integration Events" festgelegt.
- Peakstart, Peakmaximum, Retentions- bzw. Migrationszeit sowie das Peakende werden ermittelt.
- Unter jedem Peak wird der Verlauf der Basislinie zur Bestimmung von Peakfläche und Peakhöhe definiert.
- Die Integrationsergebnisse (Integration Results) werden als Liste dargestellt.

Peakidentifizierung und Quantifizierung

- Mit den Retentions- bzw. Migrationszeiten und optionalen Peakqualifiern identifiziert die Software die Peaks durch Vergleich mit bekannten Stoffen, deren Daten in der Kalibriertabelle (Calibration Table) enthalten sind.
- Mit den Peakhöhen oder Peakflächen berechnet die Software die gefundene Menge jeder integrierten Substanz durch die Verwendung der Kalibrierparameter aus der Kalibriertabelle.

Bibliothekssuche mit Spektren (nur bei ChemStations für LC 3D Systeme, LC/MS Systeme und CE Systeme)

Für alle Peaks mit gemessenen UV/VIS-Spektren kann eine automatische Suche in vorgegebenen Spektrenbibliotheken zur Identifizierung erfolgen. Weitere Informationen hierzu finden Sie im Buch *Installation und Funktion des Spektrenmoduls* .

Überprüfen der Peakreinheit (nur bei ChemStations für LC 3D Systeme, LC/MS Systeme und CE Systeme)

Für Peaks mit vorhandenen UV/VIS-Spektren kann ein Reinheitsfaktor errechnet und in einem Register gespeichert werden. Die Peakreinheit kann auch automatisch am Ende eines Analysenlaufes als Teil einer Methode ermittelt werden. Hierzu muß das Ankreuzkästchen Check Purity aktiviert werden, wenn die automatische Bibliothekssuche oder eine geeignete

Reportvorlage gewählt wird. Weitere Informationen hierzu finden Sie im Buch *Installation und Funktion des Spektrenmoduls* .

Ausdruck eines Reports

Ein Report mit qualitativen und quantitativen Ergebnissen des Analysenlaufs wird erzeugt.

Angepaßte Datenauswertung

Die angepaßte Datenauswertung ermöglicht Ihnen die Ausführung spezieller Makros zur Auswertung Ihrer analytischen Daten.

Speichern von GLP-Daten

Das Binärregister GLPSave.Reg wird zusammen mit der Methode der Datenauswertung im Standardverzeichnis der Datensätze gespeichert. Dies dient zur Sicherung von Datenqualität und Datenherkunft.

Die binäre Registerdatei GLPSave.Reg enthält folgende Informationen in einem Format, das nicht editiert werden kann und durch eine Prüfsumme geschützt ist:

- die wichtigsten Eingabeparameter des Analysengerätes (können graphisch betrachtet werden)
- chromatographische oder elektrophoretische Signale
- Integrationsergebnisse
- Ergebnisse der quantitativen Auswertung
- Methode der Datenauswertung
- Logbuch

Diese Daten werden nur gesichert, wenn die Option „Save GLP Data" durch Aktivieren des Kontrollkästchens in der RunTime Checklist gewählt wurde. Sie können diese Daten über das Menü Data Analysis der ChemStation einsehen aber nicht verändern.

Befehl oder Makro nach dem Analyselauf (Post-Run)

Falls ein Befehl oder ein Makro zur Ausführung nach dem Analysenlauf gewählt wurde, erfolgt die Ausführung, zum Beispiel das Anfertigen einer Sicherungskopie der Daten auf Diskette, nach der Datenauswertung.

Speichern einer Kopie der Methode mit den Daten

Dies erfolgt nach der Datenerfassung nur, wenn in der RunTime Checklist „Save Method with Data" aktiviert wurde. Hiermit wird die *aktuelle* Methode in das Datenverzeichnis kopiert.

Zusammenfassung des Methodenablaufs

Die folgende Liste faßt den Ablauf der Methode zusammen, für den Fall, daß alle Teile der RunTime Checklist gewählt wurden.

1 *Befehl oder Makro vor dem Analysenlauf*

Führt eine Aufgabe aus, bevor der Analysenlauf gestartet wird.

2 *Datenerfassung*

Führt ein Programm im automatischen Probegeber aus.

Injiziert die Probe.

Erfaßt die Rohdaten.

Speichert diese Daten.

3 *Speichern der Methode mit den Daten*

4 *Datenauswertung (Datenbearbeitung)*

Lädt den Datensatz.

Integriert den Datensatz.

Identifiziert und quantifiziert Peaks.

Durchsucht, wenn möglich, Spektrenbibliotheken.

Überprüft, wenn möglich, die Peakreinheit.

Druckt einen Report.

5 *Angepaßte Datenauswertung*

Führt Ihre Makros aus.

6 *Speichern von GLP-Daten*

Speichert die binäre Registerdatei GLPSave.Reg

7 *Befehl oder Makro nach dem Analysenlauf*

Führt eine Aufgabe nach vollständigem Abschluß der Analyse durch. Zum Beispiel wird ein Report nach Benutzervorgaben ausgedruckt.

3

Datenerfassung

Datenerfassung

In diesem Kapitel werden folgende Themen behandelt:

- Was ist Datenerfassung?
- Datensätze
- Verzeichnisstruktur
- Online-Monitore
- Logbuch
- Systemstatus
- Die Systemübersicht

Was ist Datenerfassung?

Während der Datenerfassung werden alle analogen Signale im Analysengerät in digitale Signale konvertiert. Das digitale Signal wird elektronisch zur ChemStation übertragen und in einem Rohdatensatz abgelegt.

Datensätze

Ein Datensatz besteht aus einer Gruppe von Dateien, die im Verzeichnis DATA als Unterverzeichnisse angelegt werden. Sie tragen einen Namen und die Dateinamenerweiterung .D. Jede Datei im Verzeichnis wird nach folgender Konvention benannt.

Name	Description
***.CH**	Rohdatensatz mit Daten aus Chromatographie oder Elektrophorese. Der Dateiname besteht aus dem Modul- oder Detektortyp, der Modulnummer und einer Identifikationsnummer für das Signal oder den Kanal. Zum Beispiel heißt der Rohdatensatz ADC1A.CH, wenn der ADC das Modul ist, 1 die Modulnummer und A die Signalidentifikation. Die Erweiterung für Chromatographie ist .CH.
***.UV**	Datensätze mit UV-Spektren. Der Dateiname besteht aus Detektortyp und Gerätenummer (nur bei Dioden-Array-Detektor und Fluorszenzdetektor).
REPORT.TXT	Reportdatensätze für die zugehörigen Rohdatensätze. Der Dateiname besteht aus Detektortyp, Gerätenummer und Signal- oder Kanalidentifikation, z. B. ADC1A.TXT.
SAMPLE.MAC	Makro zur Probeninformation.
RUN.LOG	Logbucheinträge, die während eines Analysenlaufes aufgenommen wurden. Das Logbuch zeichnet alle Vorgänge während der Analyse auf. Es werden alle etwaigen Fehlermeldungen und wichtige Statusänderungen der ChemStation aufgezeichnet.
LCDIAG.REG	Nur bei LC. Enthält Kurven zum Geräteverhalten (Gradienten, Temperaturen, Drücke etc.), Injektionsvolumina und Lösungsmittelbeschreibungen.
ACQRES.REG	Enthält die Säuleninformation. Bei GC-Systemen enthält die Datei auch das Aufgabevolumen.
GLPSAVE.REG	Teil des Datensatzes, wenn “Save GLP Data” angegeben ist.

Die Methode kann zusammen mit den Ergebnisdateien gespeichert werden. In diesem Fall wird das Methodenverzeichnis als Unterverzeichnis des Verzeichnisses des Datensatzes angelegt.

Online-Monitore

Es gibt zwei verschiedene Online-Monitore: Einen Online-Monitor für das Signal und einen weiteren für Spektren.

Online-Monitor für Signale

Der Online-Monitor für Signale ermöglicht es Ihnen, mehrere Signale und Aufzeichnungen der Geräteleistung, wenn dies vom angeschlossenen Gerät her unterstützt wird, im selben Fenster darzustellen. Sie können bequem die gewünschten Signale auswählen, um die Zeit- und Intesitätsachse zu formatieren. Für Detektoren, die diese Funktion unterstützen gibt es eine Ausgleichtaste.

Wenn Sie mit dem Cursor in die Darstellung gehen, können Sie den absoluten Signalresponse aus der Meldungszeile ablesen.

Online-Monitor für Spektren

Den Online-Monitor für Spektren gibt es nur in Verbindung mit ChemStations, die Spektrenauswertungen unterstützen. Er zeigt eine Auftragung der Absorption als Funktion der Wellenlänge. Sie können sowohl den angezeigten Wellenlängenbereich als auch die Absorptionsskala einstellen.

Logbuch

Das Logbuch zeigt Meldungen an, die vom analytischen System erzeugt wurden. Diese Meldungen können Fehlermeldungen, Systemmeldungen oder Ereignismeldungen aus einem Modul sein. Das Logbuch zeichnet diese Ereignisse auf, wobei es keine Rolle spielt, ob die Meldungen auch auf dem Bildschirm angezeigt werden. Für weitere Informationen zu einem Ereignis klicken Sie die entsprechende Zeile doppelt an, um eine Beschreibung als Hilfstext aufzurufen.

Statusinformationen

Die Statusanzeige der ChemStation

Das Statusfenster der ChemStation zeigt eine Zusammenfassung des Status' der ChemStation-Software.

Wenn eine einzige Analyse läuft, zeigt sie folgendes an:

- In der ersten Zeile des Statusfensters der ChemStation wird "Run in Progress" angezeigt.
- In der zweiten Zeile des Statusfensters der ChemStation wird der aktuelle Status der Methode angezeigt.
- In der dritten Zeile wird der Name des Rohdatensatzes zusammen mit der aktuellen Laufzeit angezeigt (bei einem GC-System werden auch Dateien für Front- und Back-Injektor angezeigt).

Das Statusfenster des Analysengerätes bietet Informationen über die Gerätemodule und die Detektoren. Sie zeigen den Status der einzelnen Komponenten und, je nach System, die aktuellen Bedingungen von zum Beispiel Druck, Gradient oder Fluß an.

Statuszeile

Der graphische Anwenderzugriff des ChemStation-Systems enthält Symbolzeilen und eine Statuszeile in der Darstellung "Method and Run Control" der ChemStation. Die Statuszeile enthält den Systemstatus und Informationen über die aktuelle Methode und Sequenz. Wenn diese nach dem Laden geändert wurden, sind sie mit einem roten Dreieck markiert. Bei einem LC-Modul der Agilent 1100 Serie macht ein gelbes EMF-Symbol den Anwender darauf aufmerksam, wenn Haltbarkeitsgrenzen von Vebrauchsmaterialien (wie z.B. der Lampe) überschritten wurden.

Systemübersicht

Sie können zu Ihrem ChemStation-System eine graphische Benutzeroberfläche aufrufen, wenn diese Funktion von dem angeschlossenen Analysengerät (wie z.B. von den LC-Modulen der Agilent 1100 Serie oder den Agilent 6890 Series GCs) unterstützt wird. Dies ermöglicht es Ihnen, den Systemstatus mit einem Blick zu überprüfen.

Wählen Sie den Befehl “System Diagram” aus dem Darstellungsmenü für “Method and Run Control” auf, um die Übersicht aufzurufen. Sie ist eine graphische Darstellung Ihres ChemStation-Systems. Jeder Bestandteil wird durch ein Symbol representiert. Unter Verwendung des folgenden Farbcodes wird der aktuelle Status angezeigt.

Farbe	**Status**
grau	inaktiv oder abgeschaltet
gelb	nicht bereit
grün	bereit
blau	in Funktion
rot	Fehler

Zusätzlich können Sie Auflistungen über die aktuellen Einstellungen der Parameter aufrufen. Abgesehen von der Statusübersicht ermöglicht die Darstellung einen schnellen Zugriff auf die Dialogfelder der Parametereinstellungen für jede Komponente des Systems.

Weitere Informationen über die Systemübersicht finden Sie im Geräteabschnitt der Online-Hilfe.

4

Integration

Integration

In diesem Kapitel werden folgende Themen behandelt:

- Was ist eine Integration?
- Was wird bei einer Integration durchgeführt?
- Die Integrationsalgorithmen der ChemStation

Was ist eine Integration?

Über die Integration werden in einem chromatographischen Signal die Peaks bestimmt und ihre Größe berechnet.

Die Integration ist erforderlich für die:

- Quantifizierung
- Berechnung der Peakreinheit (nur bei ChemStations für LC 3D, LC/MS Systeme und CE Systeme)
- Bibliothekssuchen mit Spektren (nur bei ChemStations für LC 3D, LC/MS Systeme und CE Systeme).

Was wird bei der Integration durchgeführt?

Zur Integration eines Peaks führt die Software folgende Aktionen aus:

- Für jeden Peak werden die Start- und Endpunkte bestimmt und mit vertikalen Strichmarkierungen markiert.
- Das Maximum jedes Peaks wird bestimmt. Es entspricht der Retentions- bzw. Migrationszeit.
- er konstruiert eine Basislinie,
- Fläche, Höhe und Peakbreite werden für jeden Peak berechnet.

Dieser Prozess wird mit Integrationsparametern (Integration Events) kontrolliert.

Die Integrationsalgorithmen der ChemStation

Die ChemStation enthält zwei Integrationsalgorithmen. Der Standardintegrationsalgorithmus war Bestandteil der früheren Versionen der ChemStation und befindet sich in den meisten anderen Auswertungssoftware-Paketen für analytische Daten von Agilent Technologies. Der neue Integrationsalgorithmus zielt auf bessere Robustheit, Zuverlässigkeit und Anwenderfreundlichkeit ab. Agilent Technologies empfiehlt den Einsatz des traditionellen Algorithmus' für bereits vorhandene validierte Methoden und des neuen Algorithmus' für neue Methoden.

Eine kurze Abhandlung zum Standardintegrationsalgorithmus

Um 1980 wurde der Standardintegrationsalgorithmus mit dem HP 3350 Labordatensystem eingeführt. Später wurde er in das HP 3365 ChemStation System eingegliedert und schließlich auch in die neue ChemStation.

Der Standardintegrationsalgorithmus war dazu ausgelegt, bei möglichst geringem Optimierungsaufwand durch den Anwender, den vollen Bereich der analytischen Anwendungen abzudecken.

Mit steigender Zahl an analytischen Anwendungen wurde erkannt, daß ein einziger Standardintegrator nicht für alle möglichen Anwendungen ohne Kompromisse bezüglich der Leistungsfähigkeit optimiert werden kann.

Kompatibilität

Den Standardintegrator gibt es auch weiterhin für Anwender, die bereits Methoden für den Standardintegrator entwickelt haben oder im Augenblick nicht zu dem neuen Integrator wechseln wollen. Für Datensätze, die mit dem Standardintegrator aufgenommen oder neuberechnet wurden, können beide Integratoren verwendet werden.

Eine Vorstellung des neuen Integrationsalgorithmus

Hewlett Packard hat den neuen Integrator auf Empfehlungen von Kunden entwickelt. Wir sind uns bewußt, daß ein Integratoralgorithmus variabel sein

sollte, um der verschiedenen analytischen Techniken heutzutage und in der Zukunft Rechnung zu tragen.

Allgemeine Integrationsmöglichkeiten

Die wichtigsten Möglichkeiten beider Integrationsalgorithmen sind folgende:

- eine Autointegrationsfunktion zur Einstellung anfänglicher Integrationsparameter;
- die Fähigkeit, für jedes Chromatographiesignal eine eigene Tabelle mit Integrationsparametern festzulegen, wenn mehrere Signale oder mehr als ein Detektor verwendet werden;
- die interaktive Festlegung von Integrationsparametern, die es dem Anwender ermöglichen, die Zeiten für die Ereignisse graphisch zu bestimmen;
- manuelle oder “Rubber Band” Integration für Chromatogramme oder Elektropherogramme, die eine spezielle Interpretation erfordern (diese Parameter können auch in die Methode integriert und somit automatisch aufgerufen werden);
- Darstellung und Ausdruck von Integrationsergebnissen und
- die Fähigkeit mindestens 1000 Peaks pro Chromatogramm zu integrieren.

Beide Integrationsalgorithmen enthalten folgende Befehlsgruppen:

- Definitionen für Integrationsparameter, um die Grundeinstellungen für den Integrator, Area Rejection, Peak Width und Threshold (als Parameter für die Rauschunterdrückung) festzusetzen oder zu verändern;
- Parameter zur Kontrolle der Basislinie wie “force baseline” (Basislinie erzwingen), “hold baseline” (Basislinie halten), “baseline at all valleys” (Basislinie zu jedem Tal), “baseline at the next valley” (Basislinie beim nächsten Tal), “fit baseline backwards from the end of the current peak” (rückwärtige Anpassung der Basislinie vom Ende des aktuellen Peaks);
- Kontrolle der Flächenaddition;
- negative Peakerkennung;
- Abtastprozesse einschließlich Befehlen zur Festlegung des Lösungsmittelpeaks und
- Befehle zur Integratorsteuerung, die Retentionszeitbereiche festlegen, in denen der Integrator wirksam ist.

Fähigkeiten des neuen Integrators

Der neue Integrator bietet folgende Fähigkeiten, die im Vergleich zum Standardintegrator verbessert wurden:

- optimierte Basislinienzuweisung unter Verwendung von Parametern aus individuellen Methoden und Datensätzen,
- zusätzliche Anfangsparameter zum Ausschluß von Peaks, die durch Rauschen entstanden sind (anfängliche Peakhöhe),
- bessere Peakerkennung bei verrauschten Signalen,
- Schultererkennung bei Peaks durch Verwendung der zweiten Ableitung oder des zweiten Grades bei Kurvenberechnungen und
- Erweiterung der Rechenmodi für die tangentiale Anpassung durch die Funktion geradlinig/exponentiell, bei der die tangentiale Anpassung von einem exponentiellen Verlauf in eine gerade Linie übergeht.
- verbesserte Aufnahme von Datenpunkten mit unterschiedlichen Abständen zur Verbesserung der DAD LC Datensätze, die aus DAD Spektren rekonstruiert wurden
- Anwenderfreundlichkeit — der neue Integrationsalgorithmus ist auf der Benutzeroberfläche über Symbolleisten und auch über Tastenkombinationen zugänglich.

Die beiden Integrationsalgorithmen sind genauer in Kapitel5 “Der Standardintegrationsalgorithmus” und Kapitel6 “Der neue Integrationsalgorithmus”.

5

Der Standardintegrations-algorithmus

Der Standardintegrationsalgorithmus

In diesem Kapitel werden folgende Themen behandelt:

- Der Standardintegrationsalgorithmus,
- Integrationsparameter
- Integrationsarten
- Autointegration,
- Integration
- manuelle Integration

Der Standardintegrationsalgorithmus

Der Standardintegrationsalgorithmus war Bestandteil früherer Versionen der ChemStation und ist Bestandteil der meisten anderen Auswertungssoftware-Pakete für analytische Daten von Agilent Technologies. In diesem Kapitel wird die Funktionsweise des Standardintegrationsalgorithmus' behandelt.

Zur Integration eines Signals führt der Standardintegrationsalgorithmus folgende Aktionen aus:

- Für jeden Peak werden die Start- und Endzeiten bestimmt und mit vertikalen Strichmarkierungen markiert.
- Das Maximum jedes Peaks wird bestimmt. Es entspricht der Retentions- bzw. Migrationszeit.
- er konstruiert eine Basislinie,
- Fläche, Höhe und Peakbreite werden für jeden Peak berechnet.

Dieser Vorgang wird mit den sogenannten Integrationsparametern kontrolliert. Die beiden wichtigsten Parameter sind der Schwellenwert und die Peakbreite (Threshold, Peak Width). Die ChemStation ermöglicht die Eingabe von Anfangswerten für diese und andere Parameter. Die Werte gelten für den Beginn eines Signaldatensatzes. In den meisten Fällen genügen diese Werte für eine gute Integration des gesamten Signals. Es könnten jedoch Fälle auftreten, wo Sie die Integration mit einem Zeitprogramm durchführen möchten. Dies kann mit zeitprogrammierbaren Parametern der ChemStation erreicht werden. Sie finden weitere Informationen über zeitabhängige Parameter unter "Integrationsparameter" auf Seite 91.

Funktionsweise der Integration

Der Integrationsprozess besteht aus folgenden Schritten:

- Peakerkennung (Definition der Kardinalpunkte)
- Konstruktion der Basislinie
- Berechnung der Peakfläche

Peakerkennung

Der erste Schritt der Integration ist die Peakerkennung, die aus folgenden Teilen besteht:

- Erkennen des Peakanfangs
- Definition des Peakmaximums
- Erkennen des Peakendes

Integration isolierter Peaks

Der Integrator prüft die digitalen Signaldaten mit der Annahme, daß der erste Punkt des Signals auf der Basislinie liegt. Gleichzeitig wird ein der anfänglichen Peakhalbwertsbreite entspechender gleitender Durchschnitt berechnet und als Basislinie definiert. Dieser Prozess wird solange fortgesetzt, wie der Wert unter dem vorgegebenen Schwellenwert (Threshold) liegt. Bei Überschreiten dieses Wertes kann ein Peakanfang vorliegen. Wird der Wert weiter überschritten, handelt es sich um die Anstiegsflanke eines Peaks. Der Peak wird bearbeitet und der Integrator kehrt in den Modus zur Basislinienauswertung zurück.

Der Prozess zur Erkennung eines positiven Peaks besteht aus folgenden Schritten (siehe Abbildung 2):

1 Steigung und Krümmung unter Schwellenwert: Basislinie prüfen

2 Steigung und Krümmung über Schwellenwert: Möglichkeit eines Peaks.

3 Steigung bleibt über Schwellenwert: Peak erkannt

4 Krümmung wird negativ: Wendepunkt der Anstiegsflanke.

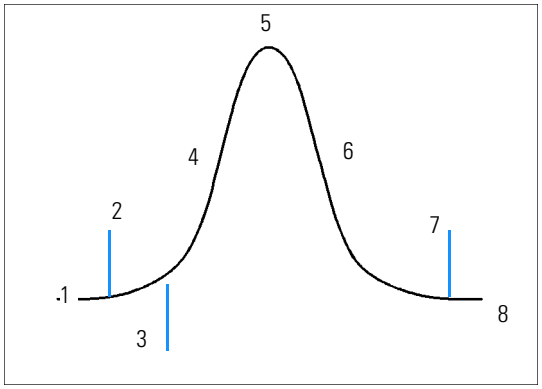
5 Steigung wird negativ: Peakmaximum

6 Krümmung wird positiv: Wendepunkt der Abstiegsflanke.

7 Steigung und Krümmung unter Schwellenwert: Peakende erreicht

8 Steigung und Krümmung unter Schwellenwert: Peakende erreicht, Basis-linie prüfen.

Abbildung 2 **Kardinalpunkte**



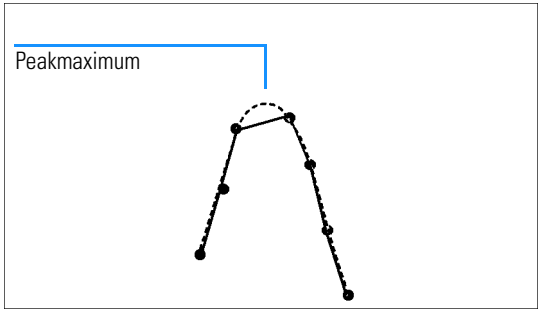
Die Schritte 3, 5 und 8 definieren die Kardinalpunkte, die den Peakstart, das Peakmaximum und das Peakende markieren.

Der Peak wird bestätigt, wenn die resultierende Peakbreite in halber Peakhöhe die Schwellenwerte erfüllt, die mit der Option Peakwidth (Peakbreite) im Dialogfeld “Integration Events” vorgegeben wurden. Sie finden weitere Einzelheiten im Abschnitt “Peakbreite (Peak Width)” auf Seite 91.

Bestimmung des Peakmaximums

An der höchsten Stelle des Peaks wird die positive Steigung negativ. Zur Berechnung der Retentions- bzw. Migrationszeiten und der Peakhöhe nimmt der Integrator den höchstgelegenen Datenpunkt auf beiden Seiten des Peaks. An diese beiden Punkte wird eine quadratische Gleichung angepaßt, deren Lösung den höchsten Punkt des Peaks ergibt.

Abbildung 3 **Bestimmung des Peakmaximums**

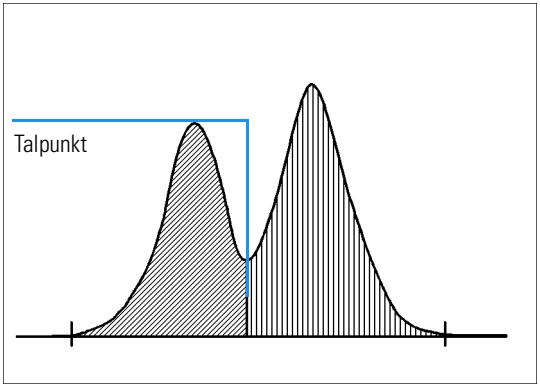


Integration überlappender Peaks

Manchmal überlappen zwei Peaks so, daß zwischen ihnen kein Basislinienpunkt vorhanden ist. Im Falle eines Basislinie Valley (BV) und eines Valley Basislinie (VB) Peaks trennt der Integrator die überlappenden Peaks durch Lotfällung vom Talpunkt zwischen den beiden Peaks. Der Integrator erkennt den Start des ersten Peaks und integriert die Fläche bis er einen Talpunkt findet. Am Talpunkt endet die Integration des ersten Peaks. Nun beginnt die Flächenaddition für den zweiten Peak. Wenn der Integrator das Ende des zweiten Peaks erkennt, wird die Flächenaddition beendet.

Sie finden Einzelheiten zur Trennung überlappender Peaks im Abschnitt “Kodierung zur Peaktrennung” auf Seite 104.

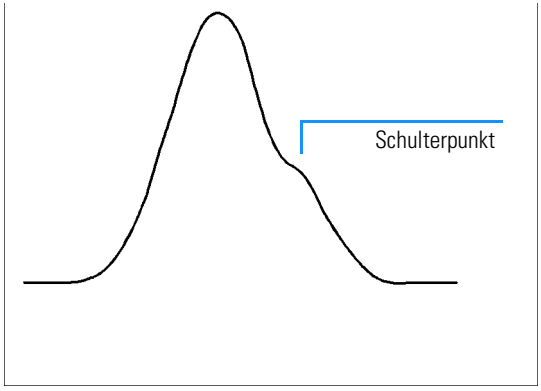
Abbildung 4 **Überlappende Peaks**



Integration von Peakschultern

Eine Schulter ist ein nicht aufgetrennter Peak auf der vorderen oder hinteren Flanke eines größeren Peaks. Es ist kein Talpunkt vorhanden, an dem sich eine negative Steigung in eine positive Steigung ändert.

Abbildung 5 **Peakschultern**



Die gefundenen Schultern werden einer Retentionszeit zugeordnet, wo die negative Steigung maximal ist. Die Fläche, die für den Hauptpeak angegeben wird, umfaßt die Fläche der Schultern.

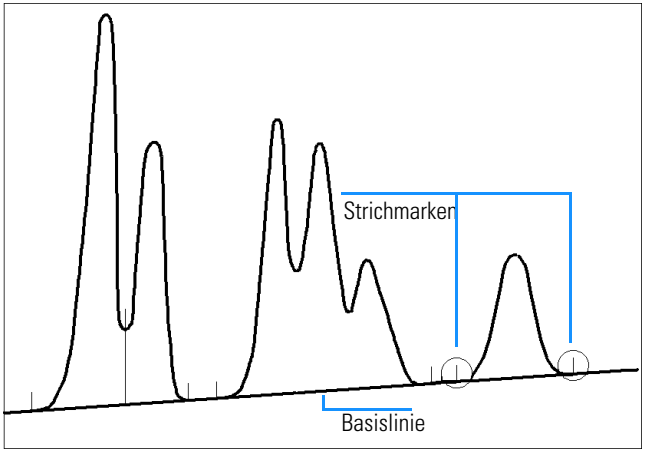
Konstruktion der Basislinie

Nach Erkennung eines Peaks wird die Basislinie konstruiert, damit die Fläche des Peaks berechnet werden kann. Die Konstruktion der Basislinie folgt der Änderung des Signals.

Der Integrator konstruiert die Basislinie als Folge gerader Linienstücke zwischen folgenden Punkten:

- Wert des Signals zu Beginn des Analysenlaufes
- den Strichmarkierungen (die Anfang und Ende eines Peaks markieren)
- Wert des Signals am Ende des Analysenlaufes; ein Punkt, der sich zur Stopzeit auf einer horizontalen Verlängerung des letzten erkannten Punktes der Basislinie befindet

Abbildung 6 **Standardmäßige Konstruktion der Basislinie**



Codes zur Beschreibung der Peaktrennung

In den Reports wird jedem Peak ein Code aus zwei Buchstaben zugeordnet, der angibt, wie die Basislinie konstruiert wurde. Falls ein dritter Buchstabe angegeben ist, gibt dieser Auskunft über die Peakart. Diese Codes werden bei den tabellarischen Ergebnisse in einer Spalte namens "Type" aufgeführt. Der erste Buchstabe beschreibt die Basislinie am Peakanfang, der zweite die Basislinie am Peakende (Codes für die Peaktrennung). Alle in den ChemStation Reports verwendeten Codes sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet:

A	Die Peakintegration wurde abgebrochen (Peakart).
b	Peakanfang oder Peakende auf der Basislinie.
H	Peakanfang oder Peakende auf horizontaler Basislinie.
N	Dies ist ein negativer Peak (Peakart).
P	Peakanfang oder Peakende durch Schneiden der Basislinie.
S	Der Integrator erkannte den Peak als Lösungsmittelpeak (Peakart).
T	Der Peak begann oder endete, während die Funktion tangentiale Anpassung (Tangent Skim) (gerade Linie) eingeschaltet war (Peakart).
V	Peakanfang oder Peakende durch Lotfällung von einem Talpunkt.
+	Der Peak ist ein flächenaufsummierter Peak (Area Summed Peak) (Peakart).
-	Der Peak ist negativ, liegt also unterhalb der Basislinie (Peakart).

Bei manueller Integration können einige andere Codes als Basislinien- oder Peaktrennungscodes erscheinen:

M	Der Peak wurde manuell integriert
f	Der Peak wurde durch manuelle Integration erzwungen. Falls ein Peak vor einem manuell integrierten Peak erscheint und sein Ende von einer manuellen Integration

beeinflußt wird, erhält der Peak die Klassifizierung „erzwungen" (forced).

R Ein Lösungsmittelpeak wurde von manueller Integration betroffen. Eine solche tangentiale Peakanpassung (Tangent Skim) wird als neuberechneter Lösungsmittelpeak klassifiziert (Peakart).

Bei eingeschalteter Option Schultererkennung (shoulder detection) wird in die Spalte “Type” ein vier-Buchstabencode eingefügt:

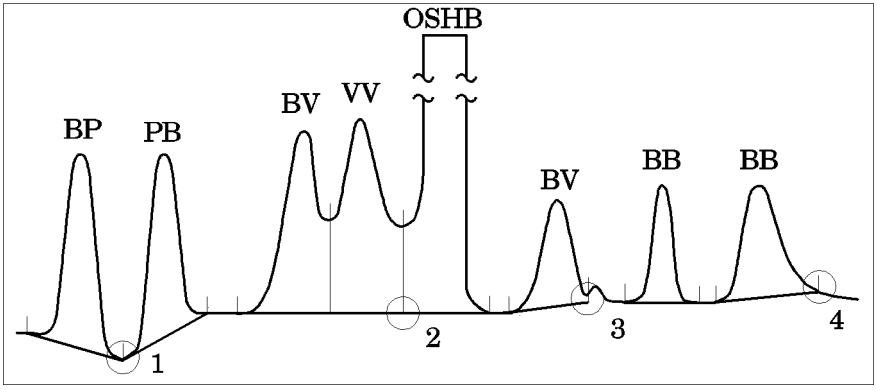
FSHO Auf der Anstiegsflanke des Peaks wurde eine Schulter entdeckt (Front Shoulder).

RSHO Auf der Abstiegsflanke des Peaks wurde eine Schulter entdeckt (Rear Shoulder).

Konstruktion einer modifizierten Basislinie

Unter bestimmten Bedingungen modifiziert der Integrator die Basislinie und schließt Punkte durch Anwendung bestimmter Regeln (siehe Abbildung 7) ein.

Abbildung 7 **Konstrunktion einer modifizierten Basislinie**



- Wenn ein Peak die Basislinie schneidet (BP und PB) geht die Basislinie durch den niedrigsten Punkt des Peaks gemäß Punkt 1 in Abbildung 7.
- Wenn ein Lösungsmittelpeak nach Verwendung einer tagentialen Anpassung nicht auf der Basislinie beginnt, wird die Basislinie durch einen Punkt gelegt, der auf einer horizontalen Verlängerung des letzten gefundenen Basislinienpunktes und dem Anfang des Lösungsmittelpeaks

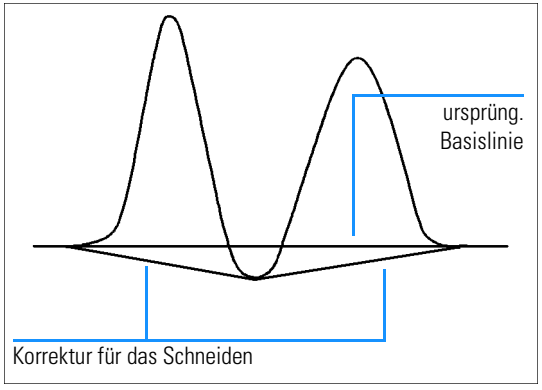
liegt, vgl. Punkt 2 in Abbildung 7. Die Buchstaben OSHB bedeuten „Overflow solvent horizontal Basislinie" und besagen, daß das Signal den linearen Bereich des Detektors überschritten hat.

- Wenn ein Peak in einem nachfolgenden Tal endet, der folgende Peak aber die Vorgabe des Wertes für “Area Reject” (Mindestfläche) nicht erreicht, wird die Basislinie vom Anfang des Peaks zum nächsten gefundenen Basislinienpunkt gemäß Punkt 3 in Abbildung 7 gezogen. Bei einem Peakstart unter denselben Umständen wird dieselbe Regel angewandt.
- Zur verbesserten Behandlung von Peaks mit Tailing werden die Zeiten registriert, in welchen der Peak die Kriterien für Anstieg und Abfall überschreitet und es wird ein Viertel dieser Zeit am Peakende zu diesem Peak addiert, vgl. Punkt 4 in Abbildung 7.

Schneiden der Basislinie

Ein Schnittpunkt tritt auf, wenn das Signal unter die konstruierte Basislinie fällt. Wenn ein Schnittpunkt mit der Basislinie vorliegt, wird dieser Teil der Basislinie neu festgelegt.

Abbildung 8 **Unterschreiten der Basislinie**

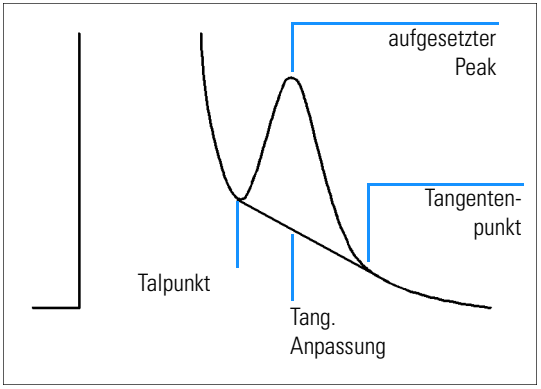


Tangentiale Anpassung

Tangentiale Anpassung ist eine Möglichkeit der Basislinienkonstruktion für Peaks, die auf der abfallenden Flanke eines Lösungsmittelpeaks erscheinen.

Der Integrator legt die Tangente durch den Talpunkt vor dem aufgesetzten Peak zum Tangentenpunkt nach dem aufgesetzten Peak, wo die Steigung des Signals gleich der Steigung der Tangenten ist.

Abbildung 9 **Tangentiale Anpassung**



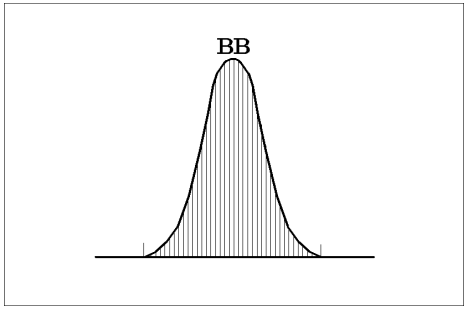
Berechnung der Peakfläche

Der letzte Schritt einer Integration besteht aus der Bestimmung der Peakfläche.

Die Fläche, die der Integrator bei der Integration berechnet, wird folgendermaßen bestimmt:

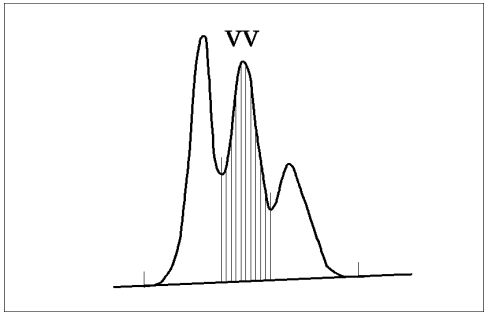
- bei Basislinien-getrennten (BB) Peaks liegt die Fläche oberhalb der Basislinie zwischen den Strichmarkierungen,

Abbildung 10 **Flächenbestimmung für Basislinien-getrennte Peaks,**



- für nicht getrennte Peaks (Valley to Valley, VV) wird die Fläche oberhalb der Basislinie durch Lotfällung zwischen den Strichmarkierungen unterteilt,

Abbildung 11 **Flächenbestimmung für Tal-zuTal-getrennte Peaks**

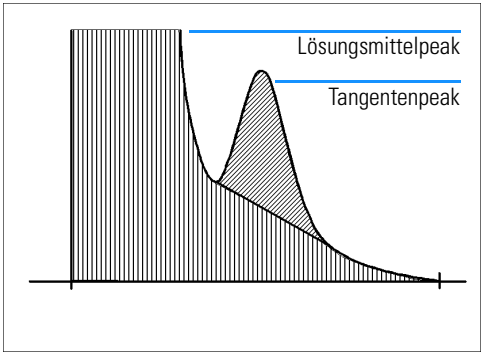


- bei tangentialen Peaks (T) liegt die Fläche oberhalb der neu bestimmten Basislinie,

- bei Lösungsmittelpeaks (S) liegt die Fläche oberhalb der horizontalen Verlängerung vom letzten gefundenen Basislinienpunkt und unterhalb der korrigierten Basislinie des tangentialen Peaks (T). Ein Lösungsmittelpeak kann eventuell zu langsam ansteigen, um erkannt zu werden oder eine Peakgruppe kann der Erfahrung zufolge ein Lösungsmittelpeak mit einigen Aufsetzern sein. Dabei handelt es sich normalerweise um eine Gruppe gemischter Peaks, wobei der erste Peak weit größer ist als der Rest. Eine einfache Lotfällung ergäbe dann eine zu große Fläche für spätere Peaks, weil sie nur auf dem ersten Peak aufsitzen. Durch Erzwingen der Erkennung des ersten Peaks als Lösungsmittelpeak werden die restlichen Peaks durch tangentiale Anpassung integriert.

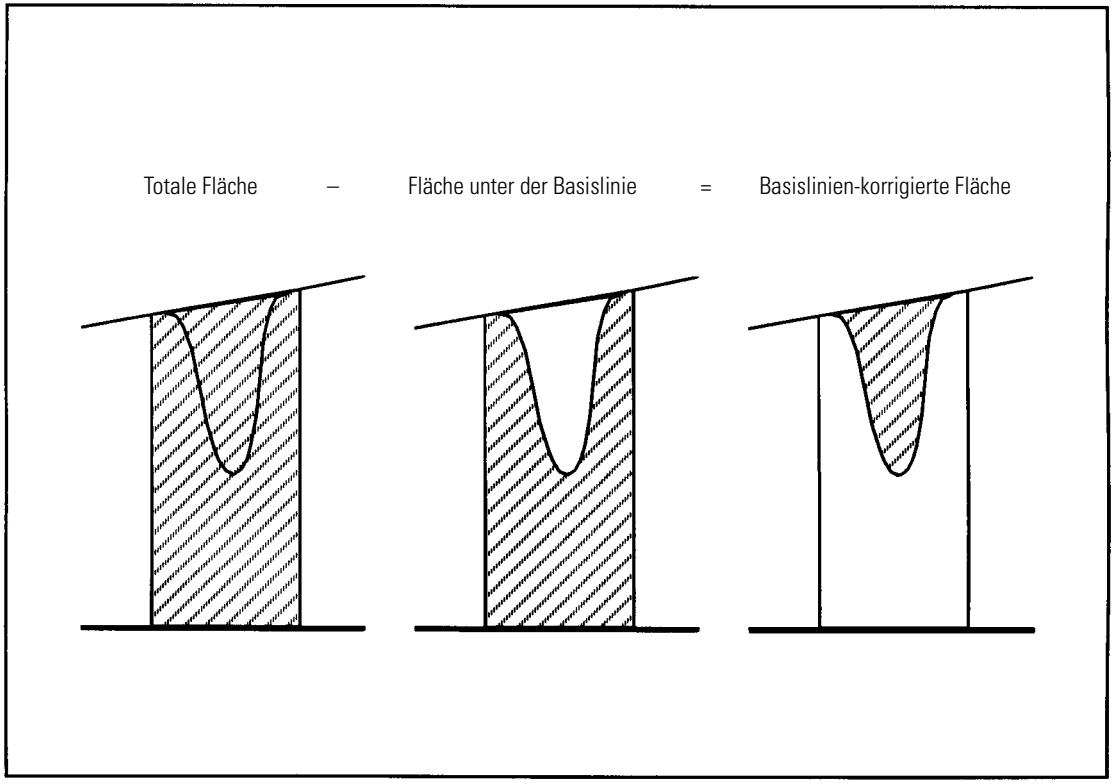
Obwohl in CE-Analysen kein Lösungsmittelpeak auftritt, kann diese Bezeichnung dennoch von der ChemStation für CE-Systeme für große Peaks eingefügt werden.

Abbildung 12 **Flächenbestimmung für Lösungsmittelpeaks und tangential abgetrennte Peaks**



- Negative Peaks liegen unterhalb der Basislinie und haben, wie in Abbildung 13 gezeigt, eine positive Fläche.

Abbildung 13 **Flächenbestimmung bei negativen Peaks**



Integrationsparameter

Für den Integrator stehen vier Anfangsparameter und neunzehn zeitprogrammierbare Parameter (Events) zur Verfügung. Viele Parameter sind Paare und bestehen aus An und Aus bzw. Start und Stop.

Anfangsparameter (Initial events)

Anfängliche Peakbreite (Initial Peakwidth)	Anfängliche Peakbreite in halber Höhe
Initial Threshold	Minimale Signalhöhe zur Peakerkennung
Initial Area Reject	Minimale Peakfläche zur Peakerkennung
Shoulder Detection	Aktiviert (on) oder deaktiviert (off) die Erkennung von Peakschultern

Peakbreite (Peak Width)

Der Standardintegrator berechnet die Peakbreite *W* mit Hilfe der folgenden Formel (siehe Abbildung 14 für weitere Informationen):

$$W = 0.3 \times (t_2 + t_3) + 0.7 \times \frac{A}{H}$$

mit:

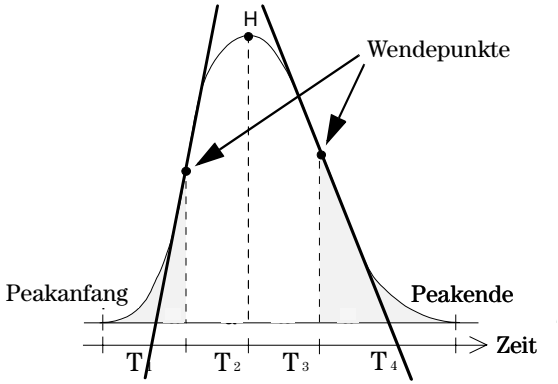
t_i = Zeitabschnitt

A = Peakfläche

H = Peakhöhe

Dies entspricht der Breite bei halber Höhe eines Gauss-Peaks, wobei $t_2 + t_3$ und A/H identisch sind. Peaks mit Tailing weisen relativ zu ihrer Halbwertbreite eine größere Breite auf, so daß die Berechnung der Anzahl theoretischer Trennböden mit dieser Breite eine zu kleine Zahl ergibt. Dennoch gibt der Integrator gute Werte für die Peakbreite überlappender Peaks an.

Abbildung 14 **Peakbreitenberechnung**



Die Voreinstellung der Peakbreite steuert die Selektivität des Integrators in der Unterscheidung zwischen Peaks und Basislinienrauschen. Eine geeignete Voreinstellung ist die Halbwertbreite eines einzelnen Peaks in Minuten.

Eine gute Einstellung der Peakbreite soll Rauschen mindestens so gut ausfiltern, daß im Rauschen keine Peaks gefunden werden, und andererseits die chromatographische bzw. elektrophoretische Information nicht verzerrt wird. Bei einer zu geringen Einstellung der Peakbreite, wird Rauschen als Peak interpretiert.

Die anfängliche Peakbreite soll der Breite des schmalsten Peaks entsprechen. Normalerweise nehmen die Peakbreiten in isokratischen bzw. isothermen Analysenläufen mit der Retentionszeit zu. In solchen Fällen könnte es erforderlich sein, die Peakbreite im Dialogfeld Integration Events für einen Analysenlauf dieser Verbreiterung anzupassen. Es können auch breitere und schmalere Peaks gemischt auftreten. Die Peakbreite kann im Dialogfeld “Integration Events” mit “Peak Width Event” zeitprogrammiert werden, um erforderliche Anpassungen vorzunehmen.

Die Peakbreite wird während der Integration automatisch aktualisiert, wenn Peaks identifiziert werden. Die Aktualisierung geschieht mit folgender Gewichtung:

$$0.75 \times \text{existing peak width} + 0.25 \times \text{width of current peak}$$

Die Aktualisierung ist auf eine Änderung von 25 % beschränkt. Bei Verwendung eines zeitprogrammierten Integrationsparameters im Integrationsprozess wird die automatische Anpassung der Peakbreite deaktiviert.

Peak Width Range (Peakbreitenbereich)

Der Peakbreitenbereich ist ein Bereich, innerhalb dessen ein Peak erkannt wird. Ein Peak mit einer Breite oberhalb oder unterhalb dieser Grenze wird *nicht* als Peak erkannt, vgl. Abbildung 15. Die Größe dieses Bereiches hängt vom Signal-Rausch Verhältnis ab. Bei einem guten Signal-Rausch Verhältnis, zum Beispiel 100:1 oder darüber, beträgt die Untergrenze des Breitenbereiches etwa ein Drittel und die Obergrenze etwa den dreifachen Wert der Breite des angegebenen Peaks. Bei einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis, zum Beispiel 5:1, wird der Bereich der Peakbreite auf 90 % bzw. 110 % der Breite des fraglichen Peaks reduziert.

Threshold (Schwellenwert)

Der Schwellenwert steuert die Rauscherkennung für die Integration.

Der Schwellenwert legt eine minimale Signalhöhe fest. Peaks, die eine geringere Höhe als den Schwellenwert aufweisen, werden vom Integrator ignoriert. Umso höher der Schwellenwert gewählt wird, desto höher muß ein Datenpunkt über der erkannten Basislinie liegen, damit ein Peakstart erkannt wird.

Der Schwellenwert wird mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Threshold} = c2^{n-6}$$

mit:

c eine Konstante ist, deren Wert vom Detektor abhängt, und

n dem Schwellenwert entspricht.

Der Schwellenwert basiert auf einer Skala, die von -20 bis 25 reicht. Die folgende Tabelle zeigt den Zusammenhang zwischen der Einstellung des Schwellenwertes und der Signalintensität (mAU) der Detektoren, die mit der ChemStation eingesetzt werden können. Es handelt sich dabei um folgende Detektoren: den HP 1090 Dioden-Array-Detektor, den Agilent CE Dioden-Array-Detektor, den HP 1046 Fluoreszenzdetektor, den HP 1050 Dioden-Array-Detektor, den variablen Wellenlängendetektor der HP 1050 Serie und den HP 1050 Multiwellenlängendetektor. Beim Zweikanal A/D-Wandler Agilent 35900C/D/E werden dieselben Werte in der Einheit mV angewandt.

Der Schwellenwert sollte nicht dazu verwendet werden, Peaks auszuschließen, deren Höhe mit den kleinsten interessierenden Peaks vergleichbar ist, weil dieser Parameter dafür nicht ausgelegt ist. Zum

Tabelle 1 **Schwellenwerte für LC Detektoren**

Einstellung	LC Detektor (mAU) A/D-Wandler (mV)
-7	0.03125
-6	0.0625
-5	0.125
-4	0.25
-3	0.5
-2	1
-1	2
0	4
1	8
2	16
3	31
4	62
5	125
6	250
7	500
8	1000

Ausschluß kleiner Peaks wird der Einsatz der Funktion “Area Reject” (Mindestfläche) empfohlen.

Area Reject (Mindestfläche)

Die Einstellung der Mindestfläche schließt Peaks aufgrund ihrer Fläche aus. Peaks, deren Flächen kleiner sind als die Mindestfläche, werden nicht in den Report aufgenommen.

Shoulder Detection (Schultererkennung)

Bei aktivierter Schultererkennung benutzt der Integrator einen erweiterten Algorithmus, der auch Schultern eines Peaks erkennen kann.

Anpassung von Schwellenwert und Peakbreite

Sowohl Peakbreite als auch Schwellenwert sind wichtige Vorgaben für die Integration. Veränderungen führen zu anderen Ergebnissen.

- Eine Erhöhung von sowohl Schwellenwert als auch Peakbreite sind nützlich, wo dominante Komponenten bei starkem Rauschen entdeckt und quantifiziert werden müssen. Eine Erhöhung der Peakbreite führt zu einer

stärkeren Filterung des Signals und eine Erhöhung des Schwellenwertes stellt sicher, daß das Rauschen ignoriert wird.

- Eine Reduzierung von Schwellenwert und Peakbreite sind zur Entdeckung und Quantifizierung von Spurenkomponenten nützlich, deren Höhen mit der Rauschhöhe vergleichbar sind. Eine Reduzierung der Peakbreite führt zu schwächerer Signalfilterung, die Reduzierung des Schwellenwertes stellt sicher, daß kleine Peaks nicht aufgrund einer zu geringen Höhe ignoriert werden.
- Wo sowohl breite, als auch schmale Peaks detektiert und quantifiziert werden müssen, ohne daß die Peakbreite individuell angepaßt wird, sollte eine schmale Peakbreite eingestellt werden und der Schwellenwert sollte ebenfalls reduziert werden.

Anpassung der Integration

Oft ist es nützlich, die Werte für Peakbreite, Schwellenwerte und Mindestfläche so zu ändern, daß Sie eine optimierte Integration Ihres Signals erhalten.

Abbildung 15 zeigt den Einfluß von Schwellenwert, Peakbreite und Mindestfläche auf die fünf Peaks des Chromatogramms.

Abbildung 15 **Verwendung von Anfangsparametern**

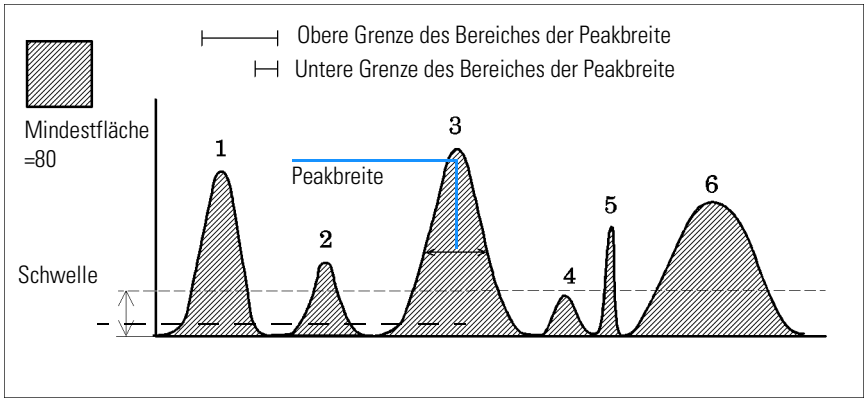


Tabelle 2 **Flächenwerte**

Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6
110	50	200	32	30	241

Ein Peak wird nur integriert, wenn die Vorgaben aller drei Integrationsparameter erfüllt werden. Mit der Peakbreite des Peaks 3, der

Mindestfläche und des Schwellenwertes aus Abbildung 15 werden nur die Peaks 1 und 3 integriert.

Tabelle 3 **Schwellenwerte**

Integrationsparameter	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6
Schwelle	darüber	darüber	darüber	darunter	darüber	darüber
Peakbreitenbereich	innerhalb	innerhalb	innerhalb	innerhalb	darunter	darüber
Mindestfläche	darüber	darunter	darüber	darunter	darunter	darüber
Peak integriert	ja	nein	ja	nein	nein	nein

Peak 1 wird integriert, da alle drei Vorgaben erfüllt werden.

Peak 2 wird nicht integriert, da die Fläche nicht die Mindestfläche erreicht.

Peak 3 wird integriert, da alle drei Vorgaben erfüllt werden.

Peak 4 wird nicht integriert, weil die Peakhöhe den Schwellenwert nicht übertrifft.

Peak 5 wird nicht integriert, weil die Peakbreite die Untergrenze des Bereiches der Peakbreite nicht erreicht.

Peak 6 wird nicht integriert, weil die Peakbreite den Wert der Obergrenze überschreitet.

Zeitprogrammierbare Parameter (Timed Events)

Sie können die Konstruktion der Basislinie mit zeitabhängigen Integrationsparametern optimieren, wenn die standardmäßige Konstruktion nicht ausreicht. Diese Parameter können zur Bestimmung der endgültigen Peakflächen und zur Korrektur schneller oder langsamer Abweichungen der Basislinie dienen. Weitere Informationen zu Integrationsparametern finden Sie in Ihrer O*nline-Hilfe*.

Tabellen mit Integrationsparametern

Jedes Signal (Chromatogramm oder Elektropherogramm), das mit einer bestimmten Methode erfaßt wurde, kann über seine eigenen Integrationsparameter verfügen, die in einer Tabelle zur Signalintegration eingestellt werden. Diese Tabellen werden nicht benutzt, bis sie speziell eingerichtet werden:

- Anwender können diese auswählen und Parameter im Dialogfeld “Integration Events” definieren.
- Anwender können “Autointegrate” wählen, wodurch die Parameter für jedes Signal optimiert werden.

Falls die individuelle Parametertabelle des Signals nicht benutzt wird, werden alle Signale mit der Standardtabelle der Integrationsparameter integriert.

Integrationsmethoden

Die ChemStation bietet folgende Integrationsmethoden:

- Autointegration,
- Integration
- manuelle Integration

Autointegration

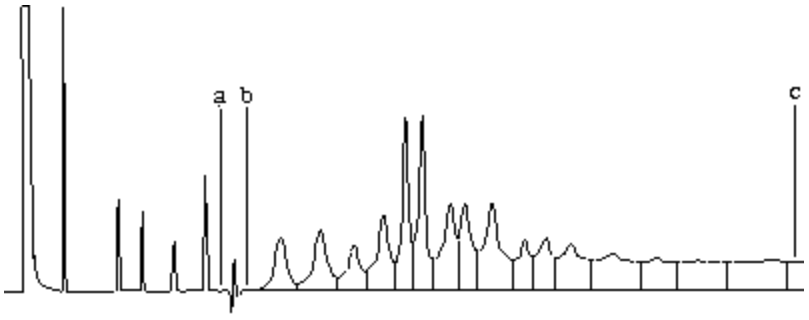
Die Autointegration untersucht den vorderen und den hinteren Bereich eines Chromatogramms, um ein Maß für das Rauschen abzuschätzen und entsprechende Anfangseinstellungen für den Schwellenwert (Threshold) und die Mindestfläche (Area Reject) festzulegen. Außerdem bestimmt die Autointegration auch einen **temporären** Wert für die Peakbreite (Peak Width), der von der Laufzeit und den unteren Detektionskriterien abhängt. Mit einem Wert für "Area Reject" von null wird probeweise eine Integration durchgeführt.

Wenn bei der probeweisen Integration keine Peaks erkannt werden, erfolgt eine Anpassung der Parameter und es wird erneut integriert. Diese Integration auf Probe kann, so notwendig, mehrere Male wiederholt werden. Aus den Breiten der ersten gefundenen Peaks wird die Anfangseinstellung für die Peakbreite ermittelt, die die Autointegration für das bearbeitete Chromatogramm verwendet.

Begrenzung

Die Autointegration ist eine nützliche Startplattform für die Integration der meisten Chromatogramme und die ersten Schritte der Methodenentwicklung. Allerdings sollte die Autointegration nicht als Ersatz für eine gute Probenvorbereitung oder Chromatographie verstanden werden.

Die Autointegration bestimmt Werte für den **Anfang** des Chromatogramms, was die Fähigkeit der Autointegration beschränkt, mit ungewöhnlichen Peaks umzugehen, die *später* im Chromatogramm auftreten können.



Autointegration

Mit der Autointegration kann es bei Chromatogrammen, die Störungen oder Peaks zu Beginn oder am Ende aufweisen, zu Problemen kommen.

Dabei sind folgende Störungen denkbar:

- umgekehrte Peaks
- Störungen oder Einschwingen der Basislinie (Ventil- oder Signalschaltungen)
- ansteigende Basislinie am Ende eines Laufs (Säulenbluten)

Wenn die Autointegration allein keine zufriedenstellenden Ergebnisse liefert, können zusätzliche Integrationsparameter programmiert werden. Im obigen Chromatogramm wurden folgende zeitprogrammierten Integrationsparameter verwendet.

Integrator Off

Integrator On, Baseline All Valleys

Set Baseline

Mit Hilfe der zeitabhängigen Integrationsparameter kann Autointegrate-Funktion gute Ergebnisse liefern.

Integration

Das Signal wird entsprechend der Integrationsparametertabelle integriert. Sie können diese Tabelle zur Optimierung der Integrationsergebnisse für eine nachfolgende Reintegration verwenden.

Sowohl Autointegrate als auch Integrate liefern Integrationsergebnisse. Autointegrate berechnet jedoch automatisch Anfangswerte von Schwellenwert und Peakbreite. Über “Edit Integration” können Sie Werte für diese Parameter vorgeben oder die Standardwerte zu verwenden.

Manuelle Integration

Dieser Integrationstyp ermöglicht Ihnen die Integration ausgewählter Peaks oder Peakgruppen. Mit Ausnahme des anfänglichen Wertes für die Mindestfläche werden im Bereich der manuellen Integration die Parametertabellen der ChemStation ignoriert.

Die manuelle Integration erlaubt Ihnen die Definitionen von Peakstart und Peakende und die Einbeziehung der damit ermittelten Peakflächen in die Quantifizierung und Reporterstellung. Manuell integrierte Peaks werden in einem Report mit dem Code M markiert.

Die manuelle Integration bietet folgende Möglichkeiten:

Draw Baseline (Basislinie ziehen) Es wird festgelegt, wo die Basislinie für einen Peak oder eine Peakgruppe verläuft. Sie können außerdem angeben, ob die Peaks dieses Bereiches an allen Talpunkten automatisch getrennt werden sollen.

Negative Peaks Es wird festgelegt, wann Flächen unterhalb der Basislinie als negative Peaks behandelt werden. Sie können außerdem angeben, ob die Peaks dieses Bereiches an allen Talpunkten automatisch getrennt werden sollen.

Tang. Anpassung Es werden die Flächen von Peaks bestimmt, indem sie durch tangentiale Anpassung von der Flanke eines Hauptpeaks abgetrennt werden. Sie können außerdem angeben, ob die Peaks dieses Bereiches an allen Talpunkten automatisch getrennt werden sollen. Die Fläche des tangential abgetrennten Peaks wird von der Fläche des Hauptpeaks abgezogen.

Split Peak (Peaktrennung) Angabe des Punktes, an dem ein Peak durch Lotfällung abgetrennt wird.

All Valleys (Alle Talpunkte) All Valleys ist ein aktiver oder inaktiver Menüpunkt. Wenn er aktiv ist, werden Peaks an allen Talpunkten im Bereich der manuellen Integration abgetrennt, wenn einer der

	Menüpunkte Draw Baseline, Negative Peaks oder Tangent Skim verwendet wird.
Trace Mode (Verfolgen des Signals)	Aktiviert einen vertikalen Pfeilcursor, der nicht vom Signal getrennt werden kann. Damit wird sichergestellt, daß Start- und Endpunkte des Peaks auf dem Chromatogramm oder Elektropherogramm liegen.
Löschen von Peaks	Löscht einen oder mehrere Peaks aus den Integrationsergebnissen.

Kodierung zur Peaktrennung

- Manuell integrierte Peaks werden im Integrationsreport mit der Kodierung MM markiert.
- Falls vor dem manuell integrierten Peak ein Peak erscheint, dessen Ende wegen diesem Peak verändert wird, trägt er die Kodierung F (für forced, erzwungen).
- Ein Lösungsmittelpeak, der durch manuelle Integration beeinflußt wurde, zum Beispiel durch tangentiale Anpassung, trägt die Kodierung R (für re-calculated solvent, neuberechneter Lösungsmittelpeak) anstatt S.

Vorgehensweise in der manuellen Integration

- Der erste Schritt einer manuellen Integration besteht in der Wahl eines Signalbereiches zur manuellen Integration. Dies geschieht durch Herausvergrößern (zoomen) des interessierenden Bereiches.
- Im nächsten Schritt wird Draw Baseline, Negative Peaks, Tangent Skim oder Delete Peak(s) gewählt.
- Die Basislinie kann nun gezeichnet werden, indem die Maus mit gedrückter linker Maustaste bewegt wird. Während der Mausbewegung wird eine Linie vom Startpunkt bis zur aktuellen Position der Maus gezeichnet. Im Falle von Delete Peak(s) wird ein Auswahlrechteck um die zu löschenden Peaks geöffnet.
- Die graphische Eingabe kann in den zwei Modi Absolute (das ist der Standardwert) und Trace (Verfolgen des Signals) erfolgen. In beiden Fällen wird in der Mitteilungszeile die Zeit und die Höhe des Cursors angezeigt.

- Im Modus “Trace” ist der Cursor ein abwärts weisender Pfeil und folgt dem Profil des Signals indem er sich von Datenpunkt zu Datenpunkt bewegt. Sie können den Trace-Modus aktivieren, wenn sich der Cursor am gewünschten Peakstart befindet, indem Sie den rechten Mausknopf drücken.
- Im Modus “Absolute” ist der Cursor ein Fadenkreuz und folgt dem Signal, erlaubt jedoch eine Positionierung an jeder Stelle des Bildschirmes. Sie können von einem Modus in den anderen umschalten, indem Sie den rechten Mausknopf drücken.
- Für jeden manuell integrierten Peak werden die Flächenwerte (Area Counts) zusammen mit der Retentions- bzw. Migrationszeit auf dem Bildschirm angezeigt.

Einfügen manueller Parameter in die Methode

Der Befehl “Copy Manual Events to Method” im Menü Integration ermöglicht Ihnen das Einfügen Ihrer manuell definierten Integration in die aktuelle Methode. Diese manuellen Parameter werden in der Methode separat gespeichert. Sie können im Dialogfeld “Integration Events” nicht eingesehen werden. Nach Laden eines Signales werden sie nur durch Aktivieren von “Apply Manual Integration Events” im Dialogfeld “Integration Events” oder durch Wahl von “Apply Manual Events from Method” im Menü “Integration” angewendet.

Die manuellen Integrationsparameter verwenden absolute Zeitfenster. Sie führen keine Anpassung bei einer Signalverschiebung durch.

6

Der neue Integrationsalgorithmus

Der neue Integrationsalgorithmus

In diesem Kapitel werden folgende Themen behandelt:

- Der neue Integrator
- Wie wird der neue Integrator an eine Konfiguration angepaßt?
- Ein Überblick über die Funktionen des neuen Integrators
- Integrieren von Peaks in der Praxis
- Mehr über den neuen Integrator
- Basislinienzuweisung
- Codes zur Beschreibung der Peaktrennung
- Tangentiale Anpassung von Peaks
- Berechnung der Peakfläche
- Integrationsparameter
- Anwendung des neuen Integrators

Der neue Integratoralgorithmus

Der neue Integratoralgorithmus zielt auf bessere bessere Robustheit, Zuverlässigkeit und Anwenderfreundlichkeit ab und wurde in der Version A.04.01 der ChemStation vorgestellt. In dieser Version der Software empfiehlen wir den Einsatz des Standard-Algorithmus' für bereits vorhandene validierte Methoden und des neuen Algorithmus' für neue Methoden.

Wie wird der neue Integrator an eine Konfiguration angepaßt?

Der neue Integrator wurde für optimale Integration unterschiedlicher Analysensysteme (LC, GC, CE) entwickelt. Zu diesem Zweck beinhaltet er

- festgelegte Integrationsparameter und
- veränderbare Integrationsparameter.

Festgelegte Integrationsparameter

Festgelegte Integrationsparameter *können nicht* über den normalen Benutzerzugriff verändert werden. Die meisten dieser Parameter wurden von Agilent Technologies für eine bestimmte Hardware/Software-Konfiguration festgelegt. Allerdings werden einige davon über Informationen aus den Methoden und Datensätzen bestimmt.

Für verschiedene chromatographische Systeme muß das Peakmaximum unterschiedlich berechnet werden. Der neue Integrator berechnet z.B. das Peakmaximum über eine der folgenden Methoden: Er kann den höchsten Datenpunkt, eine quadratische Anpassung, den ersten Moment oder eine Gaußanpassung verwenden. Die geeignete Berechnungsart wird festgelegt, um den Integrator für die jeweilige Hardware (Detektor, Säulenart usw.) und die Anwendung zu optimieren.

Wir haben die Berechnung des Peakmaximums gewählt, um das Konzept der festgelegten Integrationsparameter zu veranschaulichen. Gegenwärtig gibt es mehr als ein Dutzend weiterer festgelegter Parameter, die allerdings für die meisten Anwender als unveränderlich betrachtet werden sollten. Erfahrene Anwender können über den Einsatz geeigneter Makros auf sie zugreifen, was im *Macro Programming Guide* beschrieben ist.

Veränderliche Integrationsparameter

Die veränderlichen Integrationsparameter lassen sich dadurch als solche erkennen, daß sie für den Anwender zugänglich sind.

Zu den veränderbaren Integrationsparametern gehören:

- Integrationsparameter, die vom Anwender vor einer Analyse festgelegt werden (wie Initial Area Reject, Initial PW, usw) und
- Parameter, die zeitabhängig verändert werden können.

Funktion des verbesserten Integrators

Wenn Sie die Integrationsvorgänge in ihre grundsätzlichen Schritte trennen, muß der verbesserte Integrator genauso funktionieren wie jeder Integrator. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Integrationsergebnisse hängt davon ab, wie der Integrator die einzelnen Integrationsschritte ausführt.

Der Integrator führt beim Integrieren der Peaks folgende Schritte durch:

- er bestimmt die anfängliche Basislinie,
- er verfolgt den Verlauf der Basislinie und legt sie neu fest,
- er erkennt den Peakanfang und markiert ihn mit einer vertikalen Strichmarkierung,
- er findet das Peakmaximum und legt die Retentions- bzw. Migrationszeit ab,
- er erkennt das Peakende und markiert es mit einer vertikalen Strichmarkierung,
- er konstruiert eine Basislinie,
- er berechnet für jeden Peak die Fläche, Höhe und Peakbreite.

Dieser Vorgang wird mit den sogenannten Integrationsparametern kontrolliert. Die wichtigsten Parameter sind die anfängliche Steigungsempfindlichkeit (Slope Sensitivity), Peakbreite (Peak Width) und Mindesthöhe (Height Reject). Die ChemStation ermöglicht die Eingabe von Anfangswerten für diese und andere Parameter. Die Werte gelten für den Beginn eines Signaldatensatzes.

In den meisten Fällen genügen diese Werte für eine gute Integration des gesamten Signals. Es können jedoch Fälle auftreten, wo Sie eine Integration auf bestimmte Weise durchführen wollen.

Zur weiteren Optimierung einer Integration gibt es folgende Möglichkeiten:

- die Verwendung der zeitprogrammierten Parameter der ChemStation
- die Verwendung eines Makros, um die Funktionsweise des Integrators anzupassen.

Weitere Informationen finden Sie unter dem Abschnitt "Einstellungen der festen Parameter für den neuen Integrator und im *Macro Programming Guide, der über die Online-Hilfe verfügbar ist.*

Definition der Anfangsbasislinie

Der Integrator verwendet Parameter aus der Methode und den Datensätzen, um die Basislinie für die jeweilige Anwendung zu optimieren.

Bevor der Integrator damit beginnen kann, die Peaks zu integrieren, versucht er einen Punkt auf der Basislinie zu bestimmen. Zu Beginn der Analyse richtet der Integrator einen Anfangslevel für die Basislinie ein, wobei der erste Punkt des Signals als vorläufiger *Basislinienpunkt* verwendet wird. Danach versucht er den Anfangswert der Basislinie bezogen auf den Mittelwert des ankommenden Signals neu zu definieren. Wenn der Integrator keinen neu definierten Anfangswert für die Basislinie erzielt, behält er den Wert des ersten Datenpunktes als möglichen Anfangswert für die Basislinie bei.

Basislinienauswertung

Der Integrator betrachtet die digitalen Daten in Intervallen entsprechend der anfänglichen Peakbreite oder im Lauf der Analyse anhand der berechneten Peakbreite. Er behandelt jeden Datenpunkt als möglichen Basislinienpunkt.

Um als Basislinienpunkt zu gelten, muß ein Datenpunkt folgende Bedingungen erfüllen:

- der Datenpunkt muß innerhalb des festgelegten Basislinienbereiches liegen
- die Krümmung der Basislinie am Datenpunkt (bestimmt über die zweite Ableitung) muß unterhalb des kritischen Wertes liegen, der von der aktuellen "Slope Sensitivity" (Steigungsempfindlichkeit) festgelegt wird.

Der Integrator legt einen *Basislinienbereich* mittels der Steigung der Basislinie unter Verwendung des Algorithmus' der Basislinienauswertung fest. Die Steigung wird dabei über die erste Ableitung und die Krümmung über die zweite Ableitung bestimmt.

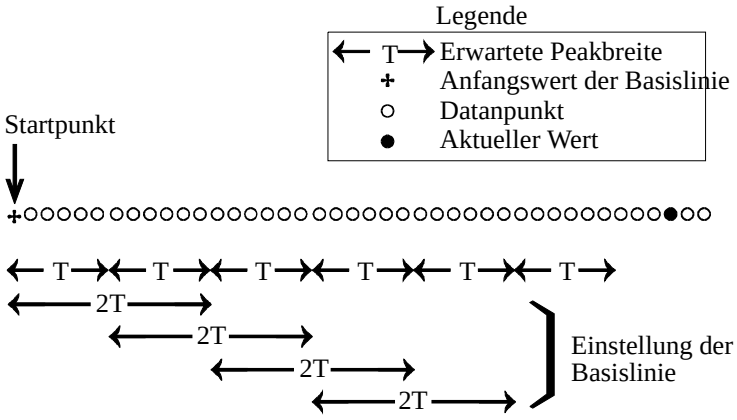
Der Anfangswert der Basislinie, der zu Beginn der Analyse festgelegt wurde, wird dann immer wieder neu bestimmt, wobei das Bestimmungsintervall von der Peakbreite abhängt. Der Wert für die Basislinie ergibt sich dann aus dem *sich ändernden Mittelwert* der Datenpunkte, die über einen von der Peakbreite abhängigen Zeitraum *innerhalb des Basislinienbereiches* liegen.

Der Integrator verfolgt den Lauf der Basislinie und legt ihren Wert periodisch neu fest, um ein mögliches Abdriften der Basislinie zu kompensieren, bis ein Peakanstieg, wie in Abbildung 16 dargestellt, erkannt wird.

Basislinienbestimmung

Der Integrator bestimmt während der Analyse die chromatographische Basislinie in regelmäßigen Abständen neu. Der Wert für die Peakbreite legt die Häufigkeit der Basislinienbestimmung fest. Wenn der Integrator eine bestimmte Anzahl an Datenpunkten gemittelt hat, legt er den Wert für die Basislinie vom anfänglichen Wert auf den Wert des aktuellen Datenpunktes. Der Integrator verfolgt den Basislinienverlauf über den nächsten Datensatz und stellt den Wert für die Basislinie erneut ein. Dieser Vorgang wird solange fortgeführt, bis der Integrator den Startpunkt eines Peaks erkennt.

Abbildung 16 **Basisinie**



Erkennen von Peakanfang, -ende und -maximum

Der Integrator erkennt einen eventuellen Peakanfang daran, daß mögliche Basislinienpunkte außerhalb des Basislinienbereiches liegen und die Krümmung der Basislinie einen durch den Integrationsparameter "slope sensitivity" (Steigungsempfindlichkeit) bestimmten Wert überschreitet. Wird diese Bedingung weiterhin erfüllt, erkennt der Integrator definitiv, daß er sich auf einem Peakanstieg befindet und der Peak wird nach folgendem Schema behandelt. Siehe Abbildung 17.

Peakanfang —

1 Steigung und Krümmung unter Schwellenwert: Basislinie prüfen.

2 Steigung und Krümmung über Schwellenwert: Möglichkeit eines Peaks.

3 Steigung bleibt über Schwellenwert: Peak erkannt, Kardinalpunkt festgelegt.

4 Krümmung wird negativ: Wendepunkt der Anstiegsflanke.

Peakmaximum —

5 Steigung wird negativ: Peakmaximum, Kardinalpunkt festgelegt.

6 Krümmung wird positiv: Wendepunkt der Abstiegsflanke.

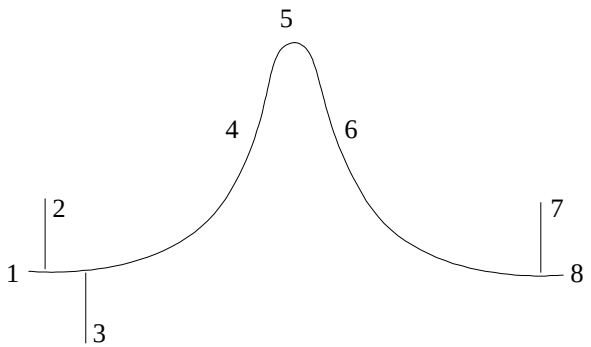
Peakende —

7 Steigung und Krümmung unter Schwellenwert: Peakende erreicht.

8 Steigung und Krümmung unter Schwellenwert: Peakende erreicht, Kardinalpunkt festgelgegt.

9 Integrator kehrt in den Modus zur Basislinienauswertung zurück.

Abbildung 17 **Integrierter Peak**



Kardinalpunkte sind Punkte, die der Integrator auswählt, um einen Peak zu definieren und zu quantifizieren. Basislinienpunkte, Talpunkte, Peakmaximum und Wendepunkte werden als Kardinalpunkte festgelegt und gespeichert. Jeder Kardinalpunkt erhält eine horizontale Koordinate in Form der abgelaufenen Zeit und eine vertikale Koordinate in Form der Höhe von der Basislinie aus betrachtet sowie andere Parameter, die der Integrator zur Berechnung der Peakflächen verwendet.

Integrieren von Peaks in der Praxis

In der Praxis muß der Integrator normalerweise mit mehr als einem komplizierten chromatographischen Problem umgehen können. Die Größe der Peaks kann innerhalb einer Analyse stark variieren, wobei die interessierenden Peaks oft nur geringe Konzentrationen aufweisen. Störungen wie Systemrauschen, Driften und Wandern können die Basislinie beeinflussen, von der aus der Integrator die Peakflächen und -höhen bestimmt. Außerdem kann es manchmal unmöglich sein, die Peaks durch einen chromatographischen Vorgang vollständig zu trennen. Wann immer möglich sollte die Chromatographie so weit optimiert sein, daß es zu einer vollständigen Trennung kommt. Wenn dies aus irgendwelchen Gründen nicht möglich ist, muß der Integrator mit überlappenden Peaks umgehen können.

Die Integration komplexer Chromatogramme ist nicht immer einfach. Der neue Integrator kann eine schlechte Chromatographie zwar nicht ausgleichen, aber er kann Rauschen, Driften oder eine unvollständige Peaktrennung besser ausgleichen und somit für schwierige Chromatogramme reproduzierbare Ergebnisse erzielen.

Mehr über den neuen Integrator

Nun soll genauer betrachtet werden, wie der Integrator den Peakanfang, das Peakmaximum und das Peakende erkennt, wie er die Kardinalpunkte für die Basislinienbestimmung festlegt und wie die Flächen berechnet werden.

Der Integrationsprozess besteht aus folgenden Schritten:

- Peakerkennung (Definition der Kardinalpunkte)
- Basislinienbestimmung
- Berechnung der Peakfläche

Peakerkennung

Der neue Integrator verwendet verschiedene *Mittel*, um einen Peak zu erkennen:

- Peakbreite
- Peakerkennungsfilter
- Bündeln (Bunching)
- Peakerkennungsalgorithmus
- Algorithmus für das Peakmaximum
- Berechnungen zu Abweichungen von der Gauß-Kurve (Tailing, überlappende Peaks, usw.)

Peakbreite

Die Voreinstellung der Peakbreite steuert die Selektivität des Integrators in der Unterscheidung zwischen Peaks und Basislinienrauschen. Um gute Leistungen zu erzielen, muß die Peakbreite auf einen Wert eingestellt werden, der der tatsächlichen Breite der Chromatographiepeaks nahe kommt.

Die Peakbreite kann auf drei Arten verändert werden:

- vor der Analyse, kann der Anwender die anfängliche Peakbreite bestimmen,
- während der Analyse vergibt der Integrator automatisch neue Werte für die Peakbreite, sobald dies zum Einhalten der Peakerkennungsfilter notwendig ist,
- während der Analyse kann die Peakbreite mit Hilfe einer zeitabhängigen Programmierung eingestellt oder verändert werden.

Peakerkennungsfilter

Der Integrator verwendet drei Peakerkennungsfilter als Mittel zur Peakerkennung, wobei er Veränderungen der Steigung und Krümmung innerhalb einer Reihe aufeinanderfolgender Datenpunkte erkennt. Diese Filter enthalten die erste Ableitung (zur Bestimmung der Steigung) und die

zweite Ableitung (zur Bestimmung der Krümmung) der vom Integrator untersuchten Datenpunkte. Die Erkennungsfilter sind wie folgt definiert:

Filter 1	Steigung und Krümmung zweier aufeinanderfolgender Datenpunkte
Filter 2	Steigung und Krümmumg von vier aufeinanderfolgenden Datenpunkten
Filter 3	Steigung und Krümmumg von acht aufeinanderfolgenden Datenpunkten

Der gerade verwendete Filter hängt von der Einstellung für die Peakbreite ab. Beispielsweise kann zu Beginn einer Analyse Filter 1 verwendet werden. Würde die Peakbreite im Lauf der Analyse ansteigen, kämen Filter 2 und möglicherweise Filter 3 zum Einsatz. Um gute Leistungen zu erzielen, muß die Peakbreite auf einen Wert eingestellt werden, der der tatsächlichen Breite der Chromatographiepeaks nahe kommt. Wenn notwendig vergibt der Integrator während der Analyse neue Werte für die Peakbreite, um die Integration zu optimieren.

Der neue Integrator kann je nach Gerät die neuen Werte für die Peakbreite auf verschiedene Arten berechnen:

Für LC/CE-Konfigurationen, berechnet der neue Integrator die Peakbreite standardmäßig über folgende zusammengesetzte Formel:

(0,3 × (rechter Wendepunkt – linker Wendepunkt) + 0,7 × Fläche/Höhe).

Für GC-Konfigurationen berechnet der neuer Integrator die Peakbreite standardmäßig als Verhältnis von Fläche/Höhe. Diese Berechnung führt zu keiner Überschätzung der Breite, wenn die Peaks oberhalb der halben Höhe überlappen.

Bei manchen Analysen können die Peaks im Analysenverlauf deutlich breiter werden. Diese Charakteristik ist typisch für isothermische GC- und isokratische LC-Analysen. Um dies auszugleichen, vergibt der Integrator automatisch neue Werte für die Peakbreite, sowie die Peaks im Laufe einer Analyse breiter werden. Er führt dies automatisch durch, bis die Funktion ausgeschaltet oder durch eine zeitabhängige Programmierung ein bestimmter Wert eingestellt wird.

Die neue Einstellung für die Peakbreite wird folgendermaßen gewichtet:

$$[0.75 \times (\text{existing peak width}) + 0.25 \times (\text{width of current peak})]$$

Wenn die Peakbreite durch eine zeitabhängige Programmierung eingestellt wird, wird die automatische Peakbreitenanpassung deaktiviert.

Bündeln (Bunching)

Der Integrator kann die Peakbreite bei Verbreiterung der Peaks nicht unendlich heraufsetzen. Die Peaks könnten dabei so breit werden, daß sie von den Peakerkennungsfiltern nicht mehr *erkannt* werden. Um das Problem dieser Begrenzung zu umgehen, verwendet der Integrator das *Bündeln (Bunching)*. Durch das Bündeln der Datenpunkte verringert der Integrator die Breite der Peaks beträchtlich und erhält dennoch dieselbe Peakfläche. Bündeln ist demnach das Mittel mit dem der Integrator breiter werdende Peaks innerhalb des Bereiches des Peakerkennungsfilters hält und so eine gute Selektivität sicher stellt.

Wenn es aktiviert ist, wird das Bündeln in Abhängigkeit von der erwarteten oder erfahrungsgemäßen Peakbreite durchgeführt. Der Algorithmus für das Bündeln ist in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4 **Kriterien für das Bündeln**

erwartete Peakbreite (T)	verwendeter Filter	Bündeln durchgeführt
0 – 10 Datenpunkte	erster	nicht
8 – 16 Datenpunkte	zweiter	nicht
12 – 24 Datenpunkte	dritter	nicht
16 – 32 Datenpunkte	zweiter	einmal
24 – 48 Datenpunkte	dritter	einmal
32 – 96 Datenpunkte	dritter, zweiter	zweimal
64 – 192 Datenpunkte	dritter, zweiter	dreimal

Der Peakerkennungsalgorithmus

Der Integrator erkennt den Peakanfang anhand eines Basislinienpunktes, der durch den Peakerkennungsalgorithmus bestimmt wurde. Der Peakerkennungsalgorithmus vergleicht zunächst die Ausgangswerte aus den Peakerkennungsfiltern mit der anfänglichen "Slope Sensitivity" (Steigungsempfindlichkeit), um den Anstiegsakkumulator zu erhöhen oder zu senken. Wenn sein Wert ≥ 15 beträgt, legt der Integrator diesen Punkt als Indikator für einen Peakanfang fest.

Der Peakerkennungsalgorithmus ist in Tabelle 5 und Tabelle 6 zusammengefaßt.

Tabelle 5 **Steigende Werte für den Anstiegsakkumulator**

Ableitungsfilter 1-3 Ausgangswerte gegenüber Steigungsempfindlichkeit	Filter 1	Filter 2	Filter 3
Steigung > |Steigungsempfindlichkeit	+ 8	+ 5	+ 3
Krümmung > Steigungsempfindlichkeit	+ 0	+ 2	+ 1
Steigung < (–) Steigungsempfindlichkeit	– 8	– 5	– 3
Steigung < |Steigungsempfindlichkeit|	– 4	– 2	– 1
Krümmung < (-) Steigungsempfindlichkeit	– 0	– 2	– 1

In Tabelle 5 bestimmt die erwartete Peakbreite den Filter, dessen Wert für Steigung und Krümmung mit der Steigungsempfindlichkeit verglichen werden. So werden beispielsweise die Zahlen für Filter 1 zu dem Anstiegsakkumulator hinzugefügt, wenn die erwartete Peakbreite klein ist. Wenn die Werte für die erwartete Peakbreite größer werden, kommen die Zahlen für Filter 2 und möglicherweise Filter 3 zum Einsatz.

Wenn der Wert für den Anstiegsakkumulator größer oder gleich 15 beträgt, erkennt der Algorithmus an dieser Stelle einen möglichen Peakanfang.

Tabelle 6 **Steigende Werte für den Abfallakkumulator**

Ableitungsfilter 1-3 Ausgangswerte gegenüber Steigungsempfindlichkeit	Filter 1	Filter 2	Filter 3
Steigung > |Steigungsempfindlichkeit	+ 8	+ 5	+ 3
Krümmung > Steigungsempfindlichkeit	+ 0	+ 2	+ 1
Steigung < (–) Steigungsempfindlichkeit	– 11	– 7	– 4
Steigung < |Steigungsempfindlichkeit|	– 28	– 18	– 11
Krümmung < (–) Steigungsempfindlichkeit	– 0	– 2	– 1

In Tabelle 6 bestimmt die erwartete Peakbreite den Filter, dessen Werte für die Steigung und Krümmung mit der Steigungsempfindlichkeit verglichen werden. So werden beispielsweise die Zahlen für Filter 1 zu dem Anstiegsakkumulator hinzugefügt, wenn die erwartete Peakbreite klein ist.

Wenn die Werte für die erwartete Peakbreite größer werden, kommen die Zahlen für Filter 2 und möglicherweise Filter 3 zum Einsatz.

Wenn der Wert für den Anstiegsakkumulator größer oder gleich 15 beträgt, erkennt der Algorithmus an dieser Stelle ein mögliches Peakende.

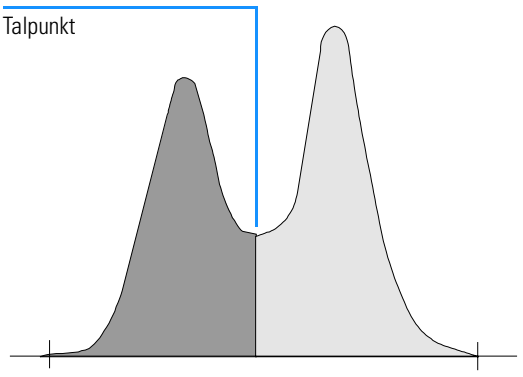
Der Algorithmus für das Peakmaximum

Das Peakmaximum wird als höchster Punkt im Chromatogramm erkannt, indem eine parabolisch verlaufende Kurve durch die höchsten Datenpunkte gelegt wird.

Berechnungen zur Abweichung von der Gauß-Kurve

Überlappende Peaks Treten auf, wenn ein neuer Peak anfängt, ehe das Ende des ersten Peaks festgelegt wurde. Die folgende Abbildung verdeutlicht, wie der Integrator mit überlappenden Peaks umgeht.

Abbildung 18 **Überlappende Peaks**



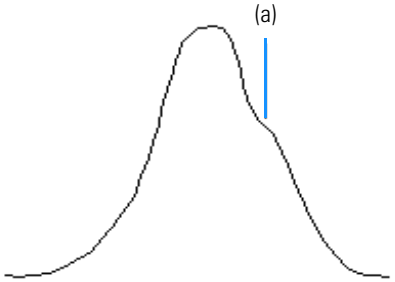
Der Integrator behandelt überlappende Peaks nach folgender Vorgehensweise:

1. Der Integrator summiert die Fläche des ersten Peaks bis zum Talpunkt auf.
2. Am Talpunkt endet die Flächensummierung für den ersten Peak und die Aufsummierung für den zweiten Peak beginnt.
3. Wenn der Integrator das Ende des zweiten Peaks erkennt, endet die Flächensummierung. Der Vorgang kann veranschaulicht werden, indem

man die überlappenden Peaks mittels einer Lotfällung vom Talpunkt zwischen den beiden Peaks auf die Basislinie trennt.

Schultern Sind nicht aufgetrennte Peaks auf der vorderen oder hinteren Flanke eines größeren Peaks. Bei einer Schulter ist kein Talpunkt vorhanden, an dem sich eine negative Steigung in eine positive Steigung ändert. Ein Peak kann eine beliebige Anzahl an Schultern auf der vorderen und/oder hinteren Flanke aufweisen..

Abbildung 19 **Peakschultern**



Schultern werden über die Krümmung des Peaks, die über die zweite Ableitung berechnet wird, erkannt. Wenn die Krümmung gegen null geht, erkennt der Integrator einen Wendepunkt, wie Punkt “a” in Abbildung 19.

- Eine mögliche Schulter auf der vorderen Flanke erkennt man am Vorhandensein eines zweiten Wendepunktes vor dem Peakmaximum. Wenn sie sich bestätigt, wird der Anfang der Schulter auf den Punkt mit der maximalen positiven Krümmung vor dem Wendepunkt festgelegt.
- Eine mögliche Schulter auf der hinteren Flanke erkennt man am Vorhandensein eines zweiten Wendepunktes vor dem Peakende oder einem Tal. Wenn sie sich bestätigt, wird der Anfang der Schulter auf den Anfangspunkt der Krümmung gelegt.

Die Retentionszeit wird über den Punkt der Schulter bestimmt, wo die negative Krümmung maximal ist. Mit Hilfe eines programmierten Integrationsparameters kann der neue Integrator auch die Schulterflächen über Lotfällung vom Wendepunkt der Peakschulter aus als normale Peaks berechnen.

Die Fläche der Schulter wird vom Hauptpeak abgezogen.

Peakschultern können mit Hilfe eines zeitabhängigen Integrationsparameters wie normale Peaks behandelt werden.

Basislinienbestimmung

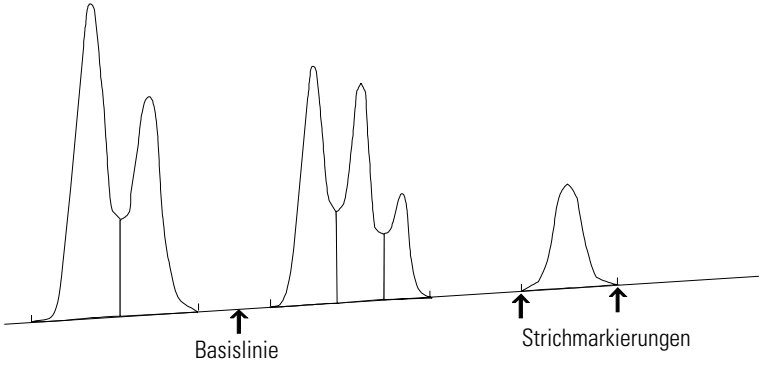
Nachdem alle Peakgruppen bestimmt und die Basislinie gefunden wurde, benötigt der Integrator den Algorithmus zur Basisliniebestimmung, der die Basislinie mit Hilfe einer *pegs-and-thread-Technik* bestimmt. Er verwendet Annäherungen an trapezförmige Flächen und die entsprechenden Höhen, um den Lauf zu normalisieren und die niedrigste Basislinie zu erhalten. Zu den Eingangsdaten für den Algorithmus zur Basislinienbestimmung gehören auch Parameter aus der Methode und den Datensätzen, die den Detektor und die Anwendung, die der Integrator zur Optimierung seiner Berechnungen verwendet, kennzeichnen.

Standardmäßige Konstruktion der Basislinie

Im einfachsten Fall konstruiert der Integrator die Basislinie als Folge gerader Linienstücke zwischen folgenden Punkten:

- dem Anfang der Basislinie,
- den Strichmarkierungen,
- dem Peakende.

Abbildung 20 **Standardmäßige Konstruktion der Basislinie**



Anfang der Basislinie

Wenn zu Beginn eines Laufes keine Basislinie gefunden wird, wird der Anfang der Basislinie auf eine der folgenden Wege festgelegt:

- Vom Startpunkt der Analyse zum ersten Basislinienpunkt, wenn der Startpunkt der Analyse niedriger ist als der erste Basislinienpunkt.
- Vom Startpunkt der Analyse zum ersten Talpunkt, wenn der Startpunkt der Analyse niedriger ist als der erste Talpunkt.
- Vom Startpunkt der Analyse zum ersten Talpunkt, wenn das erste Tal eine imaginäre Linie zwischen dem Startpunkt der Analyse und dem ersten Basislinienpunkt schneidet.
- Vom Startpunkt der Analyse zu einer horizontalen Basislinie, die zum ersten Basislinienpunkt verlängert wird.

Strichmarkierungen

Strichmarkierungen kennzeichnen den Peakanfang und das Peakende. Ihre Position wird von den Zeiten für Peakanfang und Peakende bestimmt, die in der Peaktabelle abgelegt werden.

Ende der Basislinie

Der letzte gültige Basislinienpunkt wird dazu verwendet, das Ende der Basislinie zu kennzeichnen. In den Fällen, in denen der Lauf nicht auf der Basislinie endet, wird das Ende der Basislinie über den letzten gültigen Basislinienpunkt unter Berücksichtigung des ermittelten Driftens berechnet.

Codes zur Beschreibung der Peaktrennung

In den Reports wird jedem Peak ein Code aus zwei Buchstaben zugeordnet, der angibt, wie die Basislinie konstruiert wurde. Falls ein dritter Buchstabe angegeben ist, gibt dieser Auskunft über die Peakart. Diese Codes werden bei den tabellarischen Ergebnisse in einer Spalte namens "Type" aufgeführt. Der erste Buchstabe beschreibt die Basislinie am Peakanfang, der zweite die Basislinie am Peakende (Codes für die Peaktrennung). Alle in den ChemStation Reports verwendeten Codes sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet:

A	Die Peakintegration wurde abgebrochen (Peakart).
b	Peakanfang oder Peakende auf der Basislinie.
H	Peakanfang oder Peakende auf horizontaler Basislinie.
N	Dies ist ein negativer Peak (Peakart).
P	Peakanfang oder Peakende durch Schneiden der Basislinie.
S	Der Integrator erkannte den Peak als Lösungsmittelpeak (Peakart).
T	Der Peak begann oder endete, während die Funktion tangentiale Anpassung (Tangent Skim) (gerade Linie) eingeschaltet war (Peakart).
U	Markiert den Anfang oder das Ende eines nicht zugeordneten Peaks.
V	Peakanfang oder Peakende durch Lotfällung von einem Talpunkt.
X	Exponentiale tangentiale Peakanpassung (Tangent Skim) (Peakart).
+	Der Peak ist ein flächenaufsummierter Peak (Area Summed Peak) (Peakart).

Bei manueller Integration können einige andere Codes als Basislinien- oder Peaktrennungscodes erscheinen:

M	Der Peak wurde manuell integriert

f Der Peak wurde durch manuelle Integration erzwungen. Falls ein Peak vor einem manuell integrierten Peak erscheint und sein Ende von einer manuellen Integration beeinflußt wird, erhält der Peak die Klassifizierung „erzwungen" (forced).

R Ein Lösungsmittelpeak wurde von manueller Integration betroffen. Eine solche tangentiale Peakanpassung (Tangent Skim) wird als neuberechneter Lösungsmittelpeak klassifiziert (Peakart).

Bei eingeschalteter Option Schultererkennung (Shoulder Detection) und detektierten Schultern enthalten Spalten drei und vier des Peaktrennungscodes einen der folgenden Buchstaben:

f Auf der Anstiegsflanke des Peaks wurde eine Schulter entdeckt (Front Shoulder)—Flächenbestimmung über Lotfällung.

b Auf der Abstiegsflanke des Peaks wurde eine Schulter entdeckt (Rear Shoulder)—Flächenbestimmung über Lotfällung.

f Auf der Anstiegsflanke des Peaks wurde eine Schulter entdeckt (Front Shoulder)—Flächenbestimmung über tangentiale Anpassung.

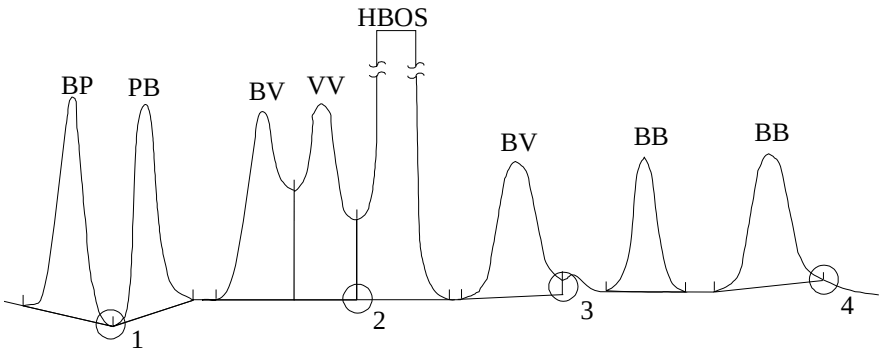
b Auf der Abstiegsflanke des Peaks wurde eine Schulter entdeckt (Rear Shoulder)—Flächenbestimmung über tangentiale Anpassung.

FALLS ein vierter Buchstabe vorhanden ist, gibt dieser zusätzliche Peakinformation (Peak flag). Ein *O* im Peakcode weist darauf hin, dass der Messbereich überschritten wurde, *U* bedeutet, dass der Messbereich unterschritten wurde und *D* bedeutet einen verzogenen Peak.

Konstruktion einer modifizierten Basislinie

Die meisten Analysen ergeben ein komplizierteres Chromatogramm als das, welches in Abbildung 21 dargestellt ist. Der Integrator verändert die Basislinie nach folgenden Regeln:

Abbildung 21 **Konstrunktion einer modifizierten Basislinie**

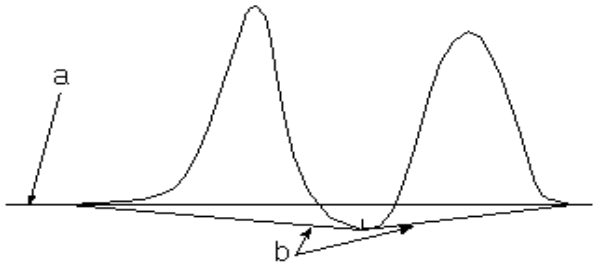


- Wenn ein Peak die Basislinie schneidet (BP und PB) geht die Basislinie durch den niedrigsten Punkt des Peaks gemäß Punkt 1 in Abbildung 21.
- Wenn ein Lösungsmittelpeak nach Verwendung einer tangentialen Anpassung nicht auf der Basislinie beginnt, wird die Basislinie durch einen Punkt gelegt, der auf einer horizontalen Verlängerung des letzten gefundenen Basislinienpunktes und dem Anfang des Lösungsmittelpeaks liegt, vgl. Punkt 2 in Abbildung 21. Die Buchstaben HBOS bedeuten “Overflow solvent horizontal Baseline” und besagen, daß das Signal den linearen Bereich des Detektors überschritten hat.
- Wenn ein Peak in einem nachfolgenden Tal endet, der folgende Peak aber die Vorgabe des Wertes für “Area Reject” (Mindestfläche) nicht erreicht, wird die Basislinie vom Anfang des Peaks zum nächsten gefundenen Basislinienpunkt gemäß Punkt 3 in Abbildung 21 gezogen. Bei einem Peakstart unter denselben Umständen wird dieselbe Regel angewandt.

Schneiden der Basislinie

Ein Schnittpunkt tritt auf, wenn das Signal unter die konstruierte Basislinie fällt (Punkt “a”). Wenn ein Schnittpunkt mit der Basislinie vorliegt, wird dieser Teil der Basislinie neu festgelegt (wie bei Punkt "b" dargestellt).

Abbildung 22 **Schneiden der Basisline**



Tangentiale Anpassung

Tangentiale Anpassung ist eine Möglichkeit der Basislinienkonstruktion für Peaks, die auf der abfallenden Flanke eines Lösungsmittelpeaks erscheinen. Wenn die Funktion vom Anwender als zeitabhängiger Parameter eingegeben wurde, kann der Lösungsmittelpeak folgendermaßen tangential angepaßt werden:

- als Geradenberechnung,
- als exponentielle Berechnung,
- als Kombination aus exponentieller und Geradenberechnung für beste Übereinstimmung (Standardeinstellung).

Die geeignete Berechnung für die tangentiale Anpassung wird bei der Konfigurierung der ChemStation-Software für eine bestimmte Anwendung festgelegt. Die Standardeinstellung ist die Kombination aus exponentieller und Geradenberechnung. Der Standardalgorithmus verwendet dieselbe Berechnung.

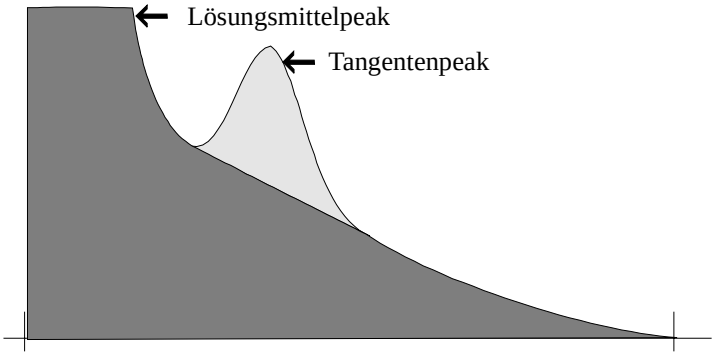
Der Wechsel von der exponentiellen zur Geradenberechnung wird so vollzogen, daß eine plötzliche Diskontinuität der Höhen oder Flächen ausgeschlossen ist.

- Wenn ein Signal weit über der Basislinie liegt, wird zur Berechnung des Tailens die Exponentialfunktion herangezogen.
- Wenn sich das Signal innerhalb des Basisliniebereiches befindet, wird zur Berechnung des Tailens die Geradenfunktion herangezogen.

Die kombinierten Berechnungen gehen in den Report als *exponentielle* oder tangentiale Anpassung ein.

Wenn die tangentiale Anpassung laufzeitabhängig angegeben ist, vergleicht der Integrator das Signal mit dem Tangentenpunkt. Der Tangentenpunkt wird durch die Annäherung an den Startpunkt des anzupassenden Peaks bestimmt, wie in Abbildung 23 dargestellt.

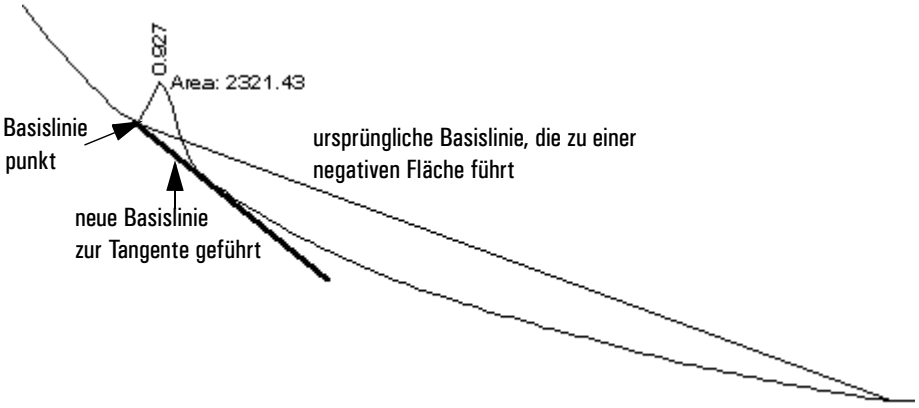
Abbildung 23 **Tangentiale Anpassung**



Manchmal führt die normale Basislinienführeung zu einer großen *negativen Fläche*. Das ist besonders dann der Fall, wenn kleine Peaks auf der abfallenden Flanke des Lösungsmittelpeaks tangential angepaßt werden. Wenn diese Fläche zur Fläche über der Basislinie addiert wird, resultiert daraus eine deutlich kleinere Peakfläche als tatsächlich vorliegt. Um derartige Fehler zu vermeiden, sucht der Integrator negative Flächen und zieht die Basislinie entsprechend der Darstellung in Abbildung 24 neu.

Abbildung 24 **Tangentiale Anpassung kleiner Peaks auf der abfallenden Flanke des**

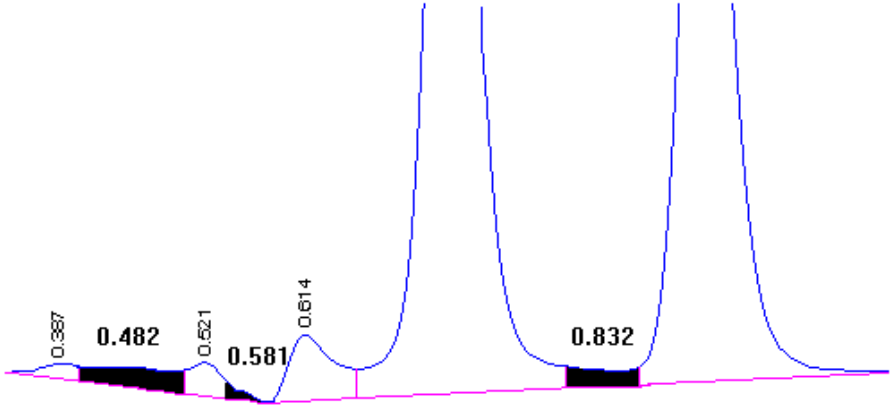
Lösungsmittelpeaks



Nicht zugeordnete Peaks

Manche Basislinienführungen ergeben kleine Fläche zwischen der Basislinie und dem Signal, die jedoch keinem bekannten Peak zugeordnet werden können. Normalerweise werden solche Flächen weder gemessen noch im Report aufgeführt. Wenn die Funktion "unassigned peaks" eingeschaltet ist, werden diese Flächen mitgemessen und im Report als "Unassigned Peaks" (nicht zugeordnete Peaks) aufgeführt. Die *Retentionszeit* für solche Flächen ergibt sich aus dem Mittelpunkt zwischen Anfang und Ende der Fläche, siehe Abbildung 25.

Abbildung 25 **Nicht zugeordnete Peaks**

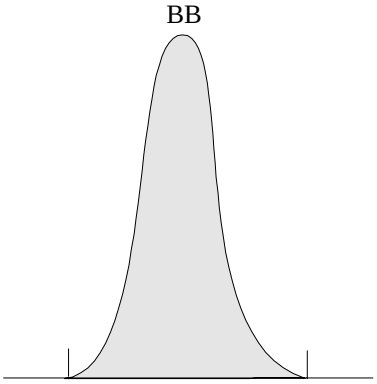


Berechnung der Peakfläche

Der letzte Schritt einer Integration besteht aus der Bestimmung der Peakfläche.

Während einer Analyse werden die Flächen unter der Basislinie aufsummiert und gespeichert. Die Peakflächen werden über die Daten aus den Kardinalpunktdateien berechnet. Die Kardinalpunkte sind die Punkte, die der Integrator auswählt, um einen Peak zu definieren und zu quantifizieren. Sie bestehen aus den Basislinienpunkten, den Talpunkten, dem Peakmaximum und den Punkten auf halber Peakhöhe. Kardinalpunkte besitzen eine horizontale Koordinate in Form der verstrichenen Zeit, eine vertikale Koordinate in Form der Höhe von der Basislinie aus sowie andere Parameter, die der Integrator zur Berechnung der Peakflächen verwendet.

Abbildung 26 **Flächenbestimmung für Basislinien-getrennte Peaks**

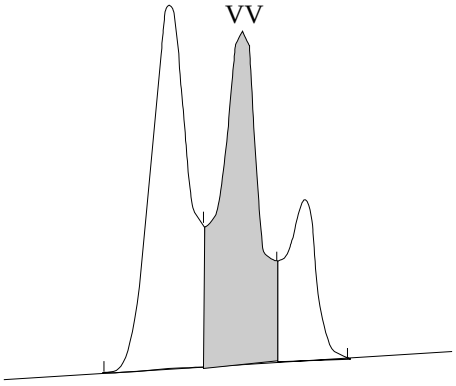


Im Fall eines einfachen getrennten Peaks wird die Peakfläche als Fläche oberhalb der Basislinie zwischen Peakanfang und Peakende bestimmt (über Strichmarkierungen gekennzeichnet).

Die Fläche, die der Integrator bei der Integration berechnet, wird folgendermaßen bestimmt:

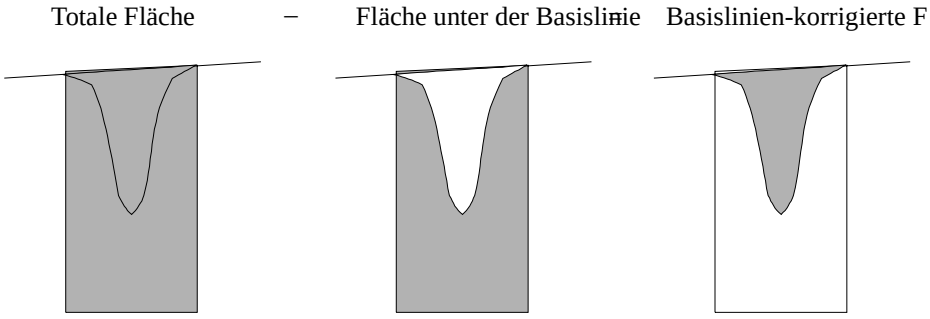
- bei Basislinien-getrennten (BB) Peaks liegt die Fläche oberhalb der Basislinie zwischen den Strichmarkierungen,
- Bei Tal-zu-Tal-getrennten (VV) Peaks wird die Fläche oberhalb der Basislinie mittels Lotfällung von den Strichmarkierungen aus geteilt.

Abbildung 27 **Flächenbestimmung für Tal-zuTal-getrennte Peaks**



- bei tangentialen Peaks (T) liegt die Fläche oberhalb der neu bestimmten Basislinie,
- bei Lösungsmittelpeaks (S) liegt die Fläche oberhalb der horizontalen Verlängerung vom letzten gefundenen Basislinienpunkt und unterhalb der korrigierten Basislinie des tangentialen Peaks (T). Ein Lösungsmittelpeak kann eventuell zu langsam ansteigen, um erkannt zu werden oder eine Peakgruppe kann der Erfahrung zufolge ein Lösungsmittelpeak mit einigen Aufsetzern sein. Dabei handelt es sich normalerweise um eine Gruppe gemischter Peaks, wobei der erste Peak weit größer ist als der Rest. Eine einfache Lotfällung ergäbe dann eine zu große Fläche für spätere Peaks, weil sie nur auf dem ersten Peak aufsitzen. Durch Erzwingen der Erkennung des ersten Peaks als Lösungsmittelpeak werden die restlichen Peaks durch tangentiale Anpassung integriert.
- Negative Peaks liegen unterhalb der Basislinie und haben, wie in Abbildung 28 gezeigt, eine positive Fläche.

Abbildung 28 **Flächenbestimmung bei negativen Peaks**



Symmetrie

Der neue Integrator behandelt die Peaksymmetrie auf folgende Weise:

- wenn die Berechnung der Peakbreite über das Verhältnis von Fläche/Höhe erfolgt, wird die Symmetrie über das Verhältnis von vorderer Fläche/hinterer Fläche bestimmt (die Berechnung erfolgt auch dann auf diese Weise, wenn der vordere bzw. der hintere Wendepunkt nicht bestimmt wurde)
- ansonsten wird die Symmetrie entsprechend den Berechnungen des Standardintegrators bestimmt

Integrationsparameter

Der neue Integrator stellt dem Anwender Anfangsparameter und zeitprogrammierbare Parameter (Events) zur Verfügung. Viele Parameter sind Paare und bestehen aus An und Aus bzw. Start und Stop.

Anfangsparameter (Initial Events)

Anfängliche Peakbreite (Initial Peakwidth)

Interne Peakbreite des Integrators zu Beginn der Analyse. Die anfängliche Peakbreite wird dazu verwendet, um die Größe des Akkumulators festzulegen, der Peakanstieg, Peakabfall und Tailing erkennt. Der Integrator kann diesen Wert im Laufe der Analyse abändern, um die Integration zu optimieren. Er wird vom Anwender als die Anzahl an Zeiteinheiten angegeben, die der Peakbreite auf halber Höhe des ersten Peaks entspricht (den Lösungsmittelpeak ausgenommen).

Steigungsempfindlichkeit (Slope Sensitivity)

Einstellung der Empfindlichkeit. Beim neuen Integrator ist die Steigungsempfindlichkeit ein Wert für die Steigung, die sich linear verändert. Darin unterscheidet er sich vom Standardintegrator, der die Höhe der Steigungsempfindlichkeit in Form von Zweierpotenzen ausdrückt.

Mindesthöhe (Height reject)

Die Mindesthöhe ist ein Parameter, der vom Anwender bei der Integration zur Rauschverringerung festgesetzt wird. Peaks, die diesen Wert unterschreiten, werden vom Integrator ignoriert. Je höher die Einstellung für die Mindesthöhe ist, desto weiter muß ein Datenpunkt über der fest-gelegten Basislinie liegen, ehe er als Peakanfang qualifiziert werden kann.

Die Mindesthöhe sollte nicht dazu verwendet werden,

	Peaks zu unterdrücken, deren Höhe der Höhe des kleinsten interessierenden Peaks nahe kommt. Verwenden Sie statt dessen den Parameter der Mindestfläche (Area Reject), um kleine Peaks auszuschließen.
Mindestfläche	Die Einstellung der Mindestfläche schließt Peaks aufgrund ihrer Fläche aus. Peaks, deren Flächen kleiner sind als die Mindestfläche, werden nicht in den Report aufgenommen.
Schulter-erkennung (Shoulder detection)	Wenn die Schultererkennung aktiviert ist, erkennt der Integrator Schultern anhand der Krümmung des Peaks, die durch die zweite Ableitung gegeben ist. Wenn die Krümmung gegen null geht, wertet der Integrator diesen Wendepunkt als möglichen Anfang einer Schulter. Wenn der Integrator vor dem Peakmaximum einen weiteren Wendepunkt findet, ist die Schulter identifiziert.

Peakbreite

Der Berechnungsalgorithmus für die Peakbreite hat sich hinsichtlich des Standardintegrators nicht geändert. Informationen finden Sie im entsprechenden Abschnitt über den Standardintegrator (siehe Peakbreite (Peak Width)auf Seite 91).

Die Voreinstellung der Peakbreite steuert die Selektivität des Integrators in der Unterscheidung zwischen Peaks und Basislinienrauschen. Um gute Leistungsfähigkeit zu sichern, muß der Wert der Peakbreite nahe an den Breiten auf halber Höhe der tatsächlichen Chromatographiepeaks liegen. Der Integrator kann den Wert für die Peakbreite im Lauf der Analyse neu festlegen, um die Integration zu optimieren.

Auswählen der Peakbreite

Eine gute Einstellung der Peakbreite sollte Rauschen mindestens so gut ausfiltern, daß im Rauschen keine Peaks gefunden werden und andererseits die Informationen des Signals nicht verzerrt werden.

- Eine geeignete Voreinstellung für die Peakbreite bei einem einzigen interessierenden Peak ist seine Breite in Zeiteinheiten als Basiswert.
- Eine geeigneten Voreinstellung für die Peakbreite, wenn der Lauf mehrere interessierende Peaks aufweist, ist der Wert der der Breite des schmalsten

Peaks entspricht. Damit wird optimale Selektivität erreicht.

Wenn die Voreinstellung für die Peakbreite zu klein gewählt wurde, kann Rauschen als Peaks interpretiert werden. Wenn breite und schmale Peaks vermischt auftreten, können Sie durch die Programmierung von zeitabhängigen Parametern die Peakbreite für bestimmte Peaks festlegen. Manchmal können die Peaks im Analysenverlauf deutlich breiter werden. Diese Charakteristik ist typisch für isothermische GC- und isokratische LC-Analysen. Um dies auszugleichen, vergibt der Integrator automatisch neue Werte für die Peakbreite, sowie die Peaks im Laufe einer Analyse breiter werden. Er führt diese Funktion solange durch bis sie deaktiviert oder die Peakbreite durch einen zeitabhängigen Parameter festgelegt wird.

Die neue Einstellung für die Peakbreite wird folgendermaßen gewichtet:

$$[0.75 \times (\text{existing peak width}) + 0.25 \times (\text{width of current peak})]$$

Wenn die Peakbreite durch eine zeitabhängige Programmierung eingestellt wird, wird die automatische Peakbreitenanpassung deaktiviert.

Verändern der Mindesthöhe und der Peakbreite

Sowohl die Peakbreite als auch die Mindeshöhe sind sehr wichtig für den Integrationsvorgang. Sie können durch Verändern dieser Werte unterschiedliche Ergebnisse erzielen.

- Erhöhen Sie sowohl die Mindesthöhe als auch die Peakbreite, wenn relativ dominierende Bestandteile detektiert und in einer Umgebung mit starkem Rauschen quantifiziert werden sollen. Eine Erhöhung der Peakbreite verbessert die Rauschfilterung, während eine Erhöhung der Mindesthöhe hin und wieder auftretendes Rauschen unterdrückt.
- Verringern Sie sowohl die Mindesthöhe als auch die Peakbreite, um Spurenkomponenten, deren Höhe dem Rauschen nahe kommt, zu detektiern und zu quantifizieren. Eine Verringerung der Peakbreite vermindert die Signalfilterung, während eine Verringerung der Mindesthöhe sicher stellt, daß auch kleine Peaks nicht aufgrund ihrer geringen Höhe vernachlässigt werden.

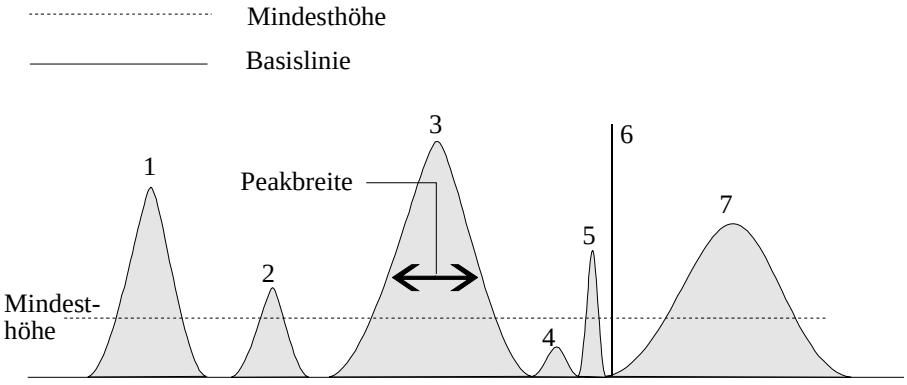
Wenn eine Analyse Peaks unterschiedlicher Peakbreiten ergibt, sollte die Peakbreite an die schmalen Peaks angepaßt sein. Die Mindesthöhe sollte reduziert werden, um sicher zu stellen, daß breite Peaks nicht aufgrund ihrer geringen Höhe vernachlässigt werden.

Anpassung der Integration

Oft ist es nützlich, die Werte für die Steigungsempfindlichkeit, die Peakbreite und die Mindesthöhe und Mindestfläche so zu ändern, daß Sie eine optimierte Integration Ihres Signals erhalten.

Abbildung 29 zeigt den Einfluß dieser Parameter auf die Integration der sieben Peaks des Chromatogramms.

Abbildung 29 **Verwendung von Anfangsparametern**



Ein Peak wird nur integriert, wenn die Vorgaben aller dreier Integrationsparameter erfüllt werden. Mit einer Peakbreite von Peak 3 und der Mindestfläche und Steigungsempfindlichkeit aus Abbildung 29 werden nur die Peaks 1 und 3 und sieben integriert.

Peak 1 wird integriert, da alle drei Vorgaben erfüllt werden.

Peak 2 wird nicht integriert, da die Fläche nicht die Mindestfläche erreicht.

Peak 3 wird integriert, da alle drei Vorgaben erfüllt werden.

Peak 4 wird nicht integriert, weil die Peakhöhe unterhalb der Mindesthöhe liegt.

Peak 5 wird integriert.

Peak 6 wird nicht integriert, weil der Peak als Spike interpretiert wird.

Peak 7 wird integriert.

Tabelle 7 **Werte für "Slope Sensitivity" (Steigungsempfindlichkeit)**

Integrationsparameter	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4	Peak 5	Peak 6	Peak 7
Mindesthöhe	darüber	darüber	darüber	darunter	darüber	darüber	darüber
Mindestfläche	darüber	darunter	darüber	darunter	darüber	darüber	darüber
kleinste Mindesthöhe	darüber	darüber	darüber	darüber	darüber	darunter	darüber
Peak integriert	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja

Zeitprogrammierbare Parameter (Timed Events)

Sie können die Konstruktion der Basislinie mit zeitabhängigen Integrationsparametern optimieren, wenn die standardmäßige Konstruktion nicht ausreicht. Diese Parameter können zur Bestimmung der endgültigen Peakflächen und zur Korrektur schneller oder langsamer Abweichungen der Basislinie dienen. Weitere Informationen zu Integrationsparametern finden Sie in Ihrer Online-Hilfe.

Tabellen mit Integrationsparametern

Jedes Signal (Chromatogramm oder Elektropherogramm) kann über seine eigenen Integrationsparameter verfügen, die in einer Tabelle zur Signalintegration eingestellt werden.

Zum Erstellen einer Tabelle mit Integrationsparametern hat ein Anwender folgende Möglichkeiten :

- er kann die Integrationsparameter manuell eingeben oder
- Autointegrate auswählen, um für jedes Signal die Anfangswerte festzusetzen.

Falls die individuelle Parametertabelle des Signals nicht benutzt wird, werden alle Signale mit der Standardtabelle mit Integrationsparameter für den entsprechenden Detektor integriert. Für jede Detektorart gibt es eine Standardtabelle mit Integrationsparametern, zum Beispiel für FID, ECD oder DAD. Die Standardtabellen mit Integrationsparametern können nicht gelöscht werden und sind immer fester Bestandteil der Methode zur Datenauswertung.

Anwendung des neuen Integrators

Der neue Integrator der ChemStation bietet folgende Methoden zur Integration eines Datensatzes:

- Integration
- Autointegration
- manuelle Integration

Integration

Das Signal wird entsprechend der Integrationsparametertabelle integriert. Sie können diese Tabelle zur Optimierung der Integrationsergebnisse für eine nachfolgende Reintegration verwenden.

Sowohl Autointegrate als auch Integrate liefern Integrationsergebnisse. Autointegrate berechnet jedoch automatisch Anfangswerte für die Steigungsempfindlichkeit und Peakbreite, während es die Funktion "Edit Integration Event" ermöglicht, zwischen selbst bestimmten und den Standardwerten zu wählen.

Autointegration

Für den neuen Integrator wurde die Autointegration so verändert, daß die gewählten Parameter stabiler sind und der Anwender mehr Informationen über die Probleme erhält, die bei der Autointegration auftreten.

Die Autointegration untersucht den vorderen und den hinteren Bereich eines Chromatogramms, um ein Maß für das Rauschen abzuschätzen und entsprechende Anfangseinstellungen für die Steigungsempfindlichkeit (Slope Sensitivity) und die Mindesthöhe (Height Reject) festzulegen. Außerdem bestimmt die Autointegration auch einen **temporären** Wert für die Peakbreite (Peak Width), der von der Laufzeit und den unteren Detektionskriterien abhängt. Mit einem Wert für "Area Reject" von null wird probeweise eine Integration durchgeführt. Wenn bei dieser Integration weniger Peaks erkannt werden, erfolgt eine Anpassung der Parameter und es wird erneut integriert. Diese Integration kann bei Bedarf mehrere Male wiederholt werden.

Nach einer geeigneten probeweisen Integration wird bei der Autointegration die Breite des ersten gefundenen Peaks als Anfangswert für die Peakbreite eingesetzt. Die Peaksymmetrie wird dazu verwendet, Peaks mit inakzeptablen Peakformen aus der Berechnung auszuschließen.

AutoIntegrate sucht zwischen den detektierten Peaks nach einem sicheren Basisliniensegment. Es wird bei der Autointegration zusammen mit der Peakbreite dazu verwendet, die Werte für die Steigungsempfindlichkeit und die Mindesthöhe neu zu definieren. Der Wert für die Mindestfläche wird über die anfängliche Peakbreite und das Maß für das Rauschen bestimmt.

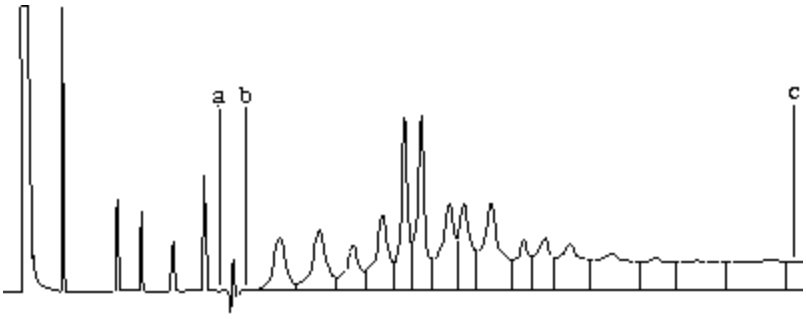
AutoIntegrate gibt einen Warnhinweis in der Meldungszeile aus, wenn:

- die Anforderungen für die Peaksymmetrie zur Berechnung der Peakbreite gelockert wurden
- zu wenig Peaks für einen genaue Berechnung der Peakbreite vorhanden sind
- keine Peaks gefunden werden (AutoIntegrate versucht ein Signal-Rausch-Verhältnis von 10:1 einzuhalten, auch wenn dann keine Peaks mehr detektiert werden)

Begrenzung

Die Autointegration ist eine nützliche Startplattform für die Integration der meisten Chromatogramme und die ersten Schritte der Methodenentwicklung. Allerdings sollte die Autointegration nicht als Ersatz für eine gute Probenvorbereitung oder Chromatographie verstanden werden.

Die Autointegration bestimmt Werte für den **Anfang** des Chromatogramms, was die Fähigkeit der Autointegration beschränkt, mit ungewöhnlichen Peaks umzugehen, die ***später*** im Chromatogramm auftreten können. Mit der Autointegration kann es bei Chromatogrammen, die Störungen oder Peaks zu Beginn oder am Ende aufweisen, zu Problemen kommen.



Bei der Autointegration gibt es Schwierigkeiten, wenn ein Chromatogramm zeitprogrammierte Integrationsparamter erfordert, um z.B. die folgenden Störungen zu umgehen:

- umgekehrte Peaks
- Störungen oder Einschwingen der Basislinie (Ventil- oder Signalschaltungen)
- ansteigende Basislinie am Ende eines Laufs (Säulenbluten)

Im obigen Chromatogramm wurden folgende zeitprogrammierten Integrationsparameter verwendet.

Integrator Off

Integrator On, Baseline All Valleys

Set Baseline

Wenn der erforderliche zeitabhängige Parameter gesetzt ist, kann die Autointegration sehr leistungsfähig arbeiten.

Manuelle Integration

Dieser Integrationstyp ermöglicht Ihnen die Integration ausgewählter Peaks oder Peakgruppen. Mit Ausnahme des anfänglichen Wertes für die Mindestfläche werden im Bereich der manuellen Integration die Parametertabellen der ChemStation ignoriert.

Die manuelle Integration erlaubt Ihnen die Definitionen von Peakstart und Peakende und die Einbeziehung der damit ermittelten Peakflächen in die Quantifizierung und Reporterstellung. Manuell integrierte Peaks werden in einem Report mit dem Code M markiert.

Die manuelle Integration bietet folgende Möglichkeiten:

Basislinie ziehen Es wird festgelegt, wo die Basislinie für einen Peak oder eine Peakgruppe verläuft. Sie können außerdem angeben, ob die Peaks dieses Bereiches an allen Talpunkten automatisch getrennt werden sollen.

Negative Peaks Es wird festgelegt, wann Flächen unterhalb der Basislinie als negative Peaks behandelt werden. Sie können außerdem angeben, ob die Peaks dieses Bereiches an allen Talpunkten automatisch getrennt werden sollen.

Tangentiale Anpassung Es werden die Flächen von Peaks bestimmt, indem sie durch tangentiale Anpassung von der Flanke eines Hauptpeaks abgetrennt werden. Sie können außerdem angeben, ob die Peaks dieses Bereiches an allen Talpunkten automatisch getrennt werden sollen. Die Fläche des tangential abgetrennten Peaks wird von der Fläche des Hauptpeaks abgezogen.

Peak-trennung Angabe des Punktes, an dem ein Peak durch Lotfällung abgetrennt wird.

Alle Talpunkte Die Einstellung “Alle Talpunkte” (All Valleys) legt fest, daß die Peaks innerhalb eines ausgewählten Integrationsbereiches über eine Basislinienkonstruktion von allen Talpunkten aus getrennt werden.

Löschen von Peaks	Löscht einen oder mehrere Peaks aus den Integrationsergebnissen.

Kodierung zur Peaktrennung

- Manuell integrierte Peaks werden im Integrationsreport mit der Kodierung MM markiert.
- Falls vor dem manuell integrierten Peak ein Peak erscheint, dessen Ende wegen diesem Peak verändert wird, trägt er die Kodierung F (für forced, erzwungen).
- Ein Lösungsmittelpeak, der durch manuelle Integration beeinflußt wurde, zum Beispiel durch tangentiale Anpassung, trägt die Kodierung R (für re-calculated solvent, neuberechneter Lösungsmittelpeak) anstatt S.

Vorgehensweise in der manuellen Integration

- Der erste Schritt einer manuellen Integration besteht in der Wahl eines Signalbereiches zur manuellen Integration. Dies geschieht durch Herausvergrößern (zoomen) des interessierenden Bereiches.
- Im nächsten Schritt wird Draw Baseline, Negative Peaks, Tangent Skim oder Delete Peak(s) gewählt.
- Die Basislinie kann nun gezeichnet werden, indem die Maus mit gedrückter linker Maustaste bewegt wird. Während der Mausbewegung wird eine Linie vom Startpunkt bis zur aktuellen Position der Maus gezeichnet. Im Falle von Delete Peak(s) wird ein Auswahlrechteck um die zu löschenden Peaks geöffnet.
- Die graphische Eingabe kann in den zwei Modi Absolute (das ist der Standardwert) und Trace (Verfolgen des Signals) erfolgen. In beiden Fällen wird in der Mitteilungszeile die Zeit und die Höhe des Cursors angezeigt.
- Im Modus “Trace” ist der Cursor ein abwärts weisender Pfeil und folgt dem Profil des Signals indem er sich von Datenpunkt zu Datenpunkt bewegt. Sie können den Trace-Modus aktivieren, wenn sich der Cursor am gewünschten Peakstart befindet, indem Sie den rechten Mausknopf drücken.
- Im Modus “Absolute” ist der Cursor ein Fadenkreuz und folgt dem Signal, erlaubt jedoch eine Positionierung an jeder Stelle des Bildschirmes. Sie können von einem Modus in den anderen umschalten, indem Sie den rechten Mausknopf drücken.

- Für jeden manuell integrierten Peak werden die Flächenwerte (Area Counts) zusammen mit der Retentions- bzw. Migrationszeit auf dem Bildschirm angezeigt.

Einfügen manueller Parameter in die Methode

Die Software ermöglicht Ihnen über den Befehl “Copy Manual Events to Method” im Menü Integration das Einfügen Ihrer manuell definierten Integration in die aktuelle Methode. Diese manuellen Parameter werden in der Methode separat gespeichert. Sie können im Dialogfeld “Integration Events” nicht eingesehen werden. Nach Laden eines Signales werden sie nur durch Aktivieren von “Apply Manual Integration Events” im Dialogfeld “Integration Events” oder durch Wahl von “Apply Manual Events from Method” im Menü “Integration” angewendet.

Die manuellen Integrationsparameter verwenden absolute Zeitfenster. Sie führen keine Anpassung bei einer Signalverschiebung durch.

7

Peak Identification (Peakerkennung)

Peak Identification (Peakerkennung)

In diesem Kapitel werden folgende Themen behandelt:

- Was ist eine Peakidentifizierung?
- Regeln zur Peakübereinstimmung
- Möglichkeiten der Peakidentifizierung
- Absolute Retentionszeiten
- Relative Retentionszeiten
- Peakqualifier
- Der Ablauf der Identifizierung

Was ist eine Peakidentifizierung?

Die Peakidentifizierung ist die Identifizierung der Komponenten einer unbekannten Probe auf der Basis ihrer chromatographischen oder elektrophoretischen Eigenschaften mit einer definierten Standard- oder Kalibrierprobe.

Die Identifizierung von Komponenten ist die Voraussetzung zur Quantifizierung. Eigenschaften jeder interessierenden Komponente werden in der Kalibriertabelle einer Methode gespeichert.

Die Peakidentifizierung erfolgt durch Vergleich jedes Peaks im Signal mit den Peaks in der Kalibriertabelle.

Die Kalibriertabelle enthält die erwarteten Retentions- bzw. Migrationszeiten der interessierenden Komponenten. Ein Peak, der mit der Retentions- bzw. Migrationszeit eines Peaks aus der Kalibriertabelle übereinstimmt, erhält die Attribute dieser Komponente, zum Beispiel Name und Responsefaktor. Peaks ohne Übereinstimmung mit einem Peak der Kalibriertabelle werden als unbekannt eingestuft. Dieser Prozeß wird durch folgende Faktoren kontrolliert:

- Retentions- bzw. Migrationszeiten für Peaks in der Kalibriertabelle, die als Zeitreferenz vorgesehen wurden;
- Festgelegte Retentions- bzw. Migrationszeitfenster der Referenzpeaks;
- Retentions- bzw. Migrationszeiten kalibrierter Peaks der Kalibriertabelle, die keine Zeitreferenzpeaks sind;
- Festgelegte Retentions- bzw. Migrationszeitfenster dieser nicht-Referenzpeaks;
- die Gegenwart weiterer qualifizierender Peaks in richtigen Verhältnissen.

Regeln zur Peakübereinstimmung

Folgende Regeln werden zur Feststellung einer Übereinstimmung zwischen Peaks angewandt:

- Wenn ein Probenpeak innerhalb des vorgegebenen Zeitfensters (Peak Matching Window) eines Peaks der Kalibriertabelle liegt, werden diesem die Attribute der Komponente der Kalibriertabelle zugeordnet.
- Wenn mehr als ein Probenpeak innerhalb des vorgegebenen Zeitfensters liegt, wird der Peak mit der geringsten Abweichung von der vorgegebenen Retentions- bzw. Migrationszeit als diese Komponente identifiziert.
- Wenn ein Peak als Zeitreferenz oder interner Standard dient, wird der größte Peak im Zeitfenster als diese Komponente identifiziert.
- Wenn Peakqualifier verwendet werden, wird das Signalverhältnis in Kombination mit dem Zeitfenster zur Identifizierug der Komponente benutzt.
- Wenn der Peak ein Peakqualifier ist, wird der gemessene Peak identifiziert, der dem Hauptpeak der Komponente am nächsten benachbart ist.
- Wenn ein Probenpeak nicht in eines der vorgegebenen Zeitfenster fällt, wird er als unbekannte Komponente aufgelistet.

Möglichkeiten der Peakidentifizierung

Eine Übereinstimmung von Probenpeaks mit den Peaks in der Kalibriertabelle der ChemStation Software kann mit verschiedenen Methoden festgestellt werden.

Absolute Retentions- bzw. Migrationszeit

Die Retentions- bzw. Migrationszeit des Probenpeaks wird mit der erwarteten Retentions- bzw. Migrationszeit der Komponente in der Kalibriertabelle verglichen.

Korrigierte Retentions- bzw. Migrationszeit

Die erwartete Retentions- bzw. Migrationszeit von Peaks wird über die aktuellen Retentions- bzw. Migrationszeiten von einem oder mehreren Referenzpeaks korrigiert. Die Peakübereinstimmung erfolgt dann auf der Basis dieser korrigierten relativen Retentions- bzw. Migrationszeiten. Die Referenzpeaks müssen in der Kalibriertabelle spezifiziert werden.

Peakqualifier

Zusätzlich zur Identifizierung von Peaks mit ihrer Retentions- bzw. Migrationszeit können Sie Peakqualifier zur Erreichung eines noch genaueren Ergebnisses einsetzen. Wenn mehr als ein Peak im Retentions- bzw. Migrationszeitfenster erscheint, sollten Peakqualifier zur Identifizierung der korrekten Komponente eingesetzt werden.

Mengenangaben (Amount Limits)

Die Grenzwerte für die Mengenangaben werden im Dialogfeld “Compound Details” definiert und zur qualifizierten Peakidentifizierung benutzt. Wenn die Mengenangabe einer identifizierten Komponente im vorgegebenen Bereich liegt, wird die Peakidentifizierung im Report aufgeführt.

Absolute Retentions- bzw. Migrationzeit

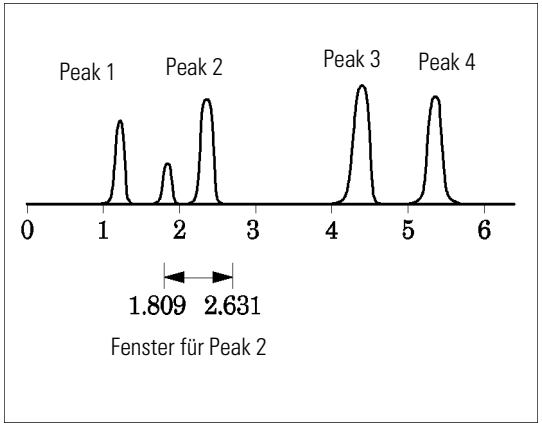
Zur Feststellung einer Peakübereinstimmung wird ein Zeitfenster für die Retentions- bzw. Migrationszeit verwendet. Dieses Zeitfenster wird um die erwartete Retentions- bzw. Migrationszeit für einen erwarteten Peak zentriert. Jeder Probenpeak, der innerhalb dieses Fensters liegt, wird zur Identifizierung dieser Komponente herangezogen.

In Abbildung 30 ist ein Retentions- bzw. Migrationszeitfenster für Peak 2 zwischen 1,809 und 2,631 Minuten eingetragen, die erwartete Retentions- bzw. Migrationszeit beträgt 2,22 Minuten. Für Peak 2 bestehen also zwei Möglichkeiten: Eine bei 1,85 und eine andere bei 2,33 Minuten. Wenn der erwartete Peak kein Referenzpeak ist, wird bei 2,22 Minuten der nächstgelegene Peak gewählt.

Wenn der erwartete Peak eine Zeitreferenz oder ein interner Standard ist, wird der größte Peak innerhalb des Fensters gewählt.

In beiden Fällen wählt die ChemStation den Peak bei 2,33 Minuten. Wenn die Peaks gleichgroß wären, würde der Peak, der dem Mittelpunkt des Zeitfensters am nächsten liegt, gewählt.

Abbildung 30 **Zeitfenster für die Retentions- bzw. Migrationszeiten**



Beim Versuch Peaks zu lokalisieren werden drei Fenstertypen benutzt.

- Fenster für Referenzpeaks, die nur auf Referenzpeaks angewendet werden,

- Fenster für nicht-Referenzpeaks werden auf alle anderen kalibrierten Peaks angewendet
- Spezielle Fenster mit Werten für einzelne Komponenten, die im Dialogfeld “Compound Details” eingestellt werden.

Die Standardwerte für diese Fenster werden im Dialogfeld “Calibration Settings” eingegeben. Die Lage jeder Seite des Fensters der Retentions- bzw. Migrationszeit für die Peakübereinstimmung ist die Summe aus absolutem und prozentual angepaßtem Fenster.

Ein Fenster von 5 % definiert eine Retentions- bzw. Migrationszeit, die innerhalb eines Rahmens von plus/minus 2.5 % der kalibrierten Retentions- bzw. Migrationszeit des Peaks liegt. Beispielsweise muß ein Peak mit einer Retentions- bzw. Migrationszeit von 2,00 Minuten in den nachfolgenden Analysen nach Ablauf von 1,95 bis 2,05 Minuten erscheinen.

Ein Fenster mit der Absolutbreite von 0,20 Minuten und einer relativen Anpassung von 10 % ergibt also ein Retentions- bzw. Migrationszeitfenster zwischen 1,80 und 2,20 Minuten.

1,80 min = 2,00 min – 0,10 min (0,20 min / 2) – 0,10 min (10 % of 2,00 min).

2,20 min = 2,00 min + 0,10 min (0,20 min / 2) + 0,10 min (10 % von 2,00 min).

Korrigierte Retentions- bzw. Migrationszeiten

Die Übereinstimmung von Peaks auf der Basis absoluter Retentions- bzw. Migrationszeiten ist leicht anwendbar aber nicht immer zuverlässig. Einzelne Retentions- bzw. Migrationszeiten können leichte Abweichungen aufgrund schwankender chromatographischer Bedingungen aufweisen. Daher können Peaks auch außerhalb des Fensters für die Peakübereinstimmung auftreten und werden nicht identifiziert.

Eine Möglichkeit zur Begegnung unvermeidlicher Schwankungen der absoluten Retentions- bzw. Migrationszeiten ist die Festlegung einer Retentions- bzw. Migrationszeit relativ zu einem oder mehreren Referenzpeaks.

Referenzpeaks werden in der Referenzspalte der Kalibriertabelle definiert. Die Methode einer relativen Peakübereinstimmung verwendet einen oder mehrere Referenzpeaks zur Positionsanpassung des Fensters zur Peakübereinstimmung. Hierdurch werden Verschiebungen der Retentions- bzw. Migrationszeiten der Probenpeaks kompensiert.

Falls in der Methode kein Referenzpeak definiert ist oder die ChemStation nicht mindestens einen Referenzpeak während des Analysenlaufes erkennen kann, werden von der Software die absoluten Retentions- bzw. Migrationszeiten verwendet.

Einzelne Referenzpeaks

Es wird für den Referenzpeak ein Fenster mit der Retentions- bzw. Migrationszeit bei seiner erwarteten Retentions- bzw. Migrationszeit erzeugt. Der größte Peak in diesem Fenster wird als Referenzpeak identifiziert. Die erwarteten Retentions- bzw. Migrationszeiten aller anderen Peaks in der Kalibriertabelle werden korrigiert. Dazu wird das Verhältnis der erwarteten zur aktuell gefundenen Retentions- bzw. Migrationszeit des Referenzpeaks herangezogen.

Mehrere Referenzpeaks

Die Korrektur der Retentions- bzw. Migrationszeit mit einem einzelnen Peak basiert auf der Annahme, daß die Abweichung der aktuellen von der

erwarteten Retentions- bzw. Migrationszeit gleichmäßig bzw. linear mit zunehmender Retentions- bzw. Migrationszeit im Analysenlauf erfolgt. Während längerer Analysenläufe ändern sich die Retentions- bzw. Migrationszeiten jedoch uneinheitlich. In solchen Fällen können bessere Ergebnisse erhalten werden, wenn mehrere Referenzpeaks eingesetzt werden, die in geeigneten Abständen über den Analysenlauf verteilt sind. Das Signal wird dann in Zonen aufgeteilt. Innerhalb jeder Zone wird dann eine lineare Abweichung der aktuellen von der erwarteten Retentions- bzw. Migrationszeit ermittelt.

HINWEIS

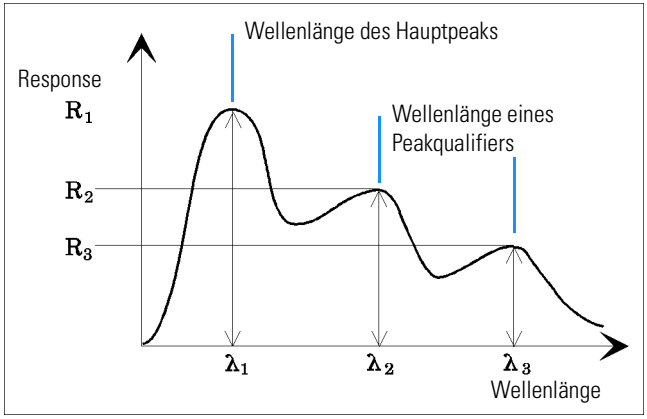
Der Algorithmus für die Zeitkorrektur kann scheitern, wenn die Retentionszeiten der Referenzpeaks zu eng zusammen liegen und nicht über den gesamten Analysenlauf verteilt sind.

Peakqualifier

Viele Komponenten können mit mehreren Signalen detektiert werden. Grundsätzlich ist diese Methode auf alle Arten der Chromatographie anwendbar, die mit mehreren Detektoren arbeiten oder mit Detektoren, die über mehrere Signalausgänge verfügen. Sie wird aber hauptsächlich in der LC mit Multiwellenlängendetektoren oder Dioden-Array-Detektoren eingesetzt. Diese Detektoren werden normalerweise so eingestellt, daß eine Wellenlänge nahe der maximalen Absorption des Hauptpeaks in der Kalibriertabelle eingesetzt wird. In Abbildung 31 ist das λ_1.

Die beiden anderen detektierten Wellenlängen können zur Bestätigung des Peaks dienen. In Abbildung 31 sind dies λ_2 und λ_3.

Abbildung 31 **Peakqualifier**



Peaks ohne Verunreinigungen weisen ein konstantes Verhältnis des Response über verschiedene Wellenlängen auf.

Der Peakqualifier weist einen anteiligen Response des Hauptpeaks auf. Die akzeptierten Grenzen des Response-Bereiches können in der Kalibriertabelle eingestellt werden, wenn die Option "Identification Details" angewählt ist. Wenn das Verhältnis zwischen dem Hauptpeak λ_1 und einem Peakqualifier, zum Beispiel, λ_3 innerhalb vorgegebener Grenzen liegt, wird die Peakidentität bestätigt.

Signalkorrelation

Unter Signalkorrelation versteht man, daß zwei Peaks, die von unterschiedlichen Detektoren innerhalb eines bestimmten Zeitfensters gemessen wurden, derselben Substanz zugeordnet werden. Das Fenster für die Signalkorrelation kann über den Parameter "SignalCorrWin" der Tabelle "QuantParm" innerhalb des _DaMethod-Registers festgelegt werden. Wenn das Fenster für die Signalkorrelation auf 0.0 gestellt ist, ist die Signalkorrelation ausgeschaltet (weitere Informationen finden Sie im *Macro Programming Guide*). Wenn die Signalkorrelation ausgeschaltet ist, werden Peaks, die zur selben Retentionszeit in zwei unterschiedlichen Detektoren erfaßt werden, als unterschiedliche Substanzen behandelt.

Standardmäßig ist das Fenster für die Signalkorrelation für LC-, LC/MS- und CE-Daten auf 0,03 Minuten und für GC-Daten auf 0,0 Minuten eingestellt.

Überprüfung der Qualifier

Wenn die Signalkorrelation eingeschaltet ist, werden standardmäßig die Qualifier für alle Arten von Datendateien überprüft. Diese Option kann abgestellt werden, indem man in der Methode innerhalb der Tabelle der "Quantification Parameters" die UseQualifiers Flag setzt (weitere Informationen entnehmen Sie bitte dem Macro Programming Guide). Die Überprüfung der Qualifier wird auch dann abgeschaltet, wenn die Signalkorrelation abgestellt ist.

Berechnung des Qualifierverhältnisses

Wenn die Überprüfung der Qualifier für eine Substanz eingeschaltet ist, wird das Größenverhältnis des Qualifiers zum Hauptpeak gegenüber den kalibrierten Grenzwerten überprüft. Je nach der Einstellung unter "Specify Report" kann die Größe über die Höhe oder die Fläche ermittelt werden.

Die Peakqualifier können genauso kalibriert werden wie die Zielsubstanzen. Der Anwender muß die erwarteten Qualifierverhältnisse nicht angeben. Sie werden automatisch berechnet:

QualRespRatio = Response des Qualifiers / Response des Hauptpeaks

beide werden zur Retentionszeit der Substanz bestimmt.

Der Parameter "QualTolerance" bestimmt den akzeptabeln Bereich für das Qualifierverhältnis, zum Beispiel, ± 20%.

Die Toleranz kann in der Kalibriertabelle über die Benutzeroberfläche (Identification Details) eingestellt werden und wird in absoluten Prozent angegeben. Zum Beispiel:

Akzeptabler Bereich = 50% ± 20% = 30% … 70%

Die Durchführung der Identifizierung

Beim Versuch der Peakidentifizierung durchläuft die Software die integrierten Daten dreimal.

Auffinden des Referenzpeaks

Im ersten Durchlauf werden die Zeitreferenzpeaks gesucht. Die Software sucht im Analysenlauf nach Retentions- bzw. Migrationszeiten, die mit denen der Referenzpeaks aus der Kalibriertabelle übereinstimmen. Ein Peak eines Analysenlaufes wird als Referenzpeak der Kalibriertabelle identifiziert, wenn dessen Retentions- bzw. Migrationszeit innerhalb des angegebenen Fensters des Peaks aus der Kalibriertabelle liegt.

Werden in diesem Fenster mehrere Peaks gefunden, wird der Peak mit der größten Fläche oder Höhe, gegebenenfalls mit einer positiven Übereinstimmung der Peakqualifier, als Referenzpeak gewählt.

Für jeden gefundenen Zeitreferenzpeak wird die Abweichung zwischen der gefundenen Retentions- bzw. Migrationszeit und der in der Kalibriertabelle festgelegten ermittelt. Dann werden alle anderen erwarteten Retentions- bzw. Migrationszeiten in der Kalibriertabelle angepaßt.

Auffinden der Internen Standardpeaks (ISTD Peak)

Im zweiten Durchlauf werden alle definierten internen Standardpeaks gesucht. Falls sie nicht bereits als ISTD identifiziert wurden, können Peaks auch als Zeitreferenz identifiziert werden. ISTD-Peaks werden durch ihre Fenster für Retentions- bzw. Migrationszeiten und Peakqualifier identifiziert. Werden in demselben ISTD-Fenster mehrere Peaks gefunden, dann wird der größte Peak gewählt.

Suchen aller anderer kalibrierter Peaks

Im dritten Durchgang werden alle anderen Peaks aus der Kalibriertabelle gesucht. Diese nicht-Referenzpeaks der Kalibriertabelle werden mit dem Retentions- bzw. Migrationszeitfenster auf Übereinstimmung mit den Peaks des Analysenlaufes untersucht.

Jeder kalibrierte Nicht-Referenzpeak wird in der Kalibriertabelle mit seiner Retentions- bzw. Migrationszeit angegeben. Diese wird an den

entsprechenden Lauf anhand der Vor-Identifizierung der Zeitreferenzpeaks angepaßt. Das Fenster für die Retentions- bzw. Migrationszeit des kalibrierten Peaks wird anhand der korrigierten Retentions- bzw. Migrationszeiten des kalibrierten Peaks angepaßt.

Werden mehrere Peaks in demselben Fenster gefunden, wird der Peak mit der Retentions- bzw. Migrationszeit gewählt, die am nächsten der erwarteten Retentions- bzw. Migrationszeit liegt und die auch die Vorgaben zum Qualifier erfüllt.

Klassifizierung unidentifizierter Peaks

Falls Peaks verbleiben, die nicht identifiziert sind, werden sie als unbekannt klassifiziert. Die ChemStation versucht die unbekannten Peaks derselben Komponente zu einer Gruppe zusammenzufassen. Wenn ein Peak in mehreren Signalen entdeckt wurde, werden die Peaks mit derselben Retentions- bzw. Migrationszeit in jedem Signal dieser Komponente zugeordnet.

Unbekannte Peaks werden im Report aufgenommen, wenn die entsprechende Vorgabe im Dialogfeld “Calibration Settings” eingestellt wurde.

8

Quantifizierung

Quantifizierung

In diesem Kapitel werden folgende Themen behandelt:

- Was ist Quantifizierung?
- Rechenmethoden in der Quantifizierung
- Berechnung von Area% und Height% (Flächen% und Höhen%)
- Berechnungen mit einem externen Standard (ESTD)
- Berechnung von normierten Flächenprozenten (Norm%)
- Berechnungen mit einem internen Standard (ISTD)
- Quantifizierung unidentifizierter Peaks

Was ist Quantifizierung?

Nach Integration und Identifizierung der Peaks ist der nächste Auswertungsschritt die Quantifizierung. Die Quantifizierung bestimmt aufgrund der Peakfläche oder Peakhöhe die Konzentration einer Substanz in einer Probe.

Eine quantitative Analyse besteht aus mehreren Schritten, die wie folgt zusammengefaßt werden können:

- Die zu analysierende Substanz muß bekannt sein.
- Eine Analysenmethode zur Vermessung von Proben mit dieser Substanz muß vorhanden sein.
- Es müssen eine oder mehrere Proben vermessen werden, die eine bekannte Konzentration der Substanz erhalten, so daß deren Responsefaktor ermittelt werden kann.

  Alternativ können auch mehrere Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen dieser Substanzen vermessen werden, falls Ihr Detektor einen nichtlinearen Response aufweist. Dieser Prozeß wird Mehrpunktkalibrierung (**Multi-Level Calibration**) genannt .
- Die Probe mit einer unbekannten Konzentration der Substanz wird zur Ermittlung von Peakfläche oder Peakhöhe vermessen.
- Bei bekanntem Responsefaktor kann die unbekannte Konzentration ermittelt werden.

Für einen korrekten Vergleich einer Probe mit unbekannter und einer mit bekannter Konzentration müssen die Daten unter identischen Bedingungen erfaßt und bearbeitet werden.

Rechenmethoden in der Quantifizierung

Die ChemStation bietet folgende Berechnungsmöglichkeiten zur Konzentrationsbestimmung der Substanz einer Mischung:

- Prozentualer Anteil
- Normalisierungen
- Berechnungen mit einem externen Standard (ESTD)
- Prozentualer Anteil relativ zu einem externen Standard (ESTD%)
- Berechnungen mit einem internen Standard (ISTD)
- Prozentualer Anteil relativ zu einem internen Standard (ISTD%)

Die Berechnungen zur Konzentrationsbestimmung einer Substanz in einer unbekannten Probe hängen vom Typ der Quantifizierung ab. Jede Berechnungsart verwendet Peakfläche oder Peakhöhe, erzeugt jedoch einen unterschiedlichen Report.

Korrekturfaktoren

Zur quantitativen Berechnung werden vier verschiedene Korrekturfaktoren eingesetzt: **Absolute Response Factor** (absoluter Responsefaktor), **Multiplier** (Multiplikationsfaktor), **Dilution Factor** (Verdünnungsfaktor) und **Sample Amount** (Probenmenge). Diese Faktoren dienen der Korrektur von Kalibrierungen hinsichtlich variierendem Detektorresponse, verschiedenen Konzentrationen, Probenverdünnung, Probenmengen und zur Umrechnung von Konzentrationseinheiten.

Absoluter Responsefaktor

Der absolute Responsefaktor einer Substanz ist definiert als Quotient der Substanzmenge geteilt durch die gemessene Fläche oder Höhe des zugehörigen Standardpeaks. Der absolute Responsefaktor wird stets für Kalibrierungen verwendet und korrigiert den Detektorresponse für einzelne Probenbestandteile.

Multiplikationsfaktor

Mit dem Multiplikationsfaktor können die Ergebnisse jeder Substanz multipliziert werden. Multiplikatoren können dazu eingesetzt werden, Konzentrationseinheiten umzurechnen.

Verdünnungsfaktor

Der Verdünnungsfaktor ist eine Zahl, mit der alle Ergebnisse multipliziert werden, bevor der Report gedruckt wird. Sie können den Verdünnungsfaktor zur Anpassung der Skala, in der die Ergebnisse angegeben werden, oder zur Korrektur von Konzentrationsänderungen, zum Beispiel durch eine Probenvorbereitung, verwenden. Er dient auch für alle anderen Berechnung mit einem konstanten Faktor.

Probenmenge

Bei der Wahl der Rechenmethoden ESTD% oder ISTD% werden in den Reporttypen ESTD und ISTD relative anstelle absoluter Werte angegeben. Das bedeuted, daß die Menge jeder Substanz als prozentualer Anteil an der Probengesamtmenge angegeben wird. Die Probenmenge dient in den Reports

ESTD% und ISTD% zur Umrechnung der Absolutmenge der analysierten Substanzen in relative Werte. Dies geschieht mit einer Division durch den angegebenen Wert.

Unkalibrierte Rechenmethoden

Unkalibrierte Rechenmethoden erfordern keine Kalibriertabelle.

Area% und Height% (Flächen% und Höhen%)

Die Berechnungsart Flächen% berechnet die Fläche jedes Peaks der Probe als prozentualen Anteil an der Gesamtfläche aller Peaks eines Analysenlaufes. Die Berechnung von Flächen% erfordert keine vorherige Kalibrierung und hängt in bestimmten Grenzen des Detektors nicht von der injizierten Probenmenge ab. Es werden keine Responsefaktoren berücksichtigt. Falls alle Substanzen identische Responsefaktoren aufweisen, kann die Angabe Flächen% eine Näherung für die vorhandenen Mengen der Substanzen darstellen.

Flächen% wird routinemäßig dort eingesetzt, wo die qualitative Information ausreicht oder zur Erstellung von Kalibriertabellen für andere Kalibrierverfahren.

Die Angabe Höhen% berechnet die Höhe jedes Peaks der Probe als prozentualen Anteil an der Gesamthöhe aller Peaks eines Analysenlaufes.

Kalibrierte Rechenverfahren

Die Methoden Externer Standard (ESTD), Normierung und Interner Standard (ISTD) erfordern jeweils bekannte Responsefaktoren und daher eine Kalibriertabelle. Die Kalibriertabelle steuert die Umrechnung einer Fläche oder Höhe in eine Einheit, die Sie durch die Wahl des Verfahrens festlegen können.

Berechnungen mit externem Standard (ESTD)

Das ESTD-Verfahren dient zur Quantifizierung, wobei Standards und Proben unter identischen Bedingungen aufgenommen wurden. Die Ergebnisse der unbekannten Proben werden mit der Kalibriertabelle verglichen und damit die Menge der unbekannten Probe errechnet.

Das ESTD-Verfahren verwendet absolute Responsefaktoren und unterscheidet sich damit vom ISTD-Verfahren. Die Responsefaktoren werden in einer Kalibrierung gewonnen und gespeichert. In den nachfolgenden Probenläufen werden die Substanzmengen durch Anwendung dieser Responsefaktoren auf die gemessenen Mengen errechnet. Bei Verfahren dieses Typs muß beachtet werden, daß die injizierte Probenmenge von einem Lauf zum nächsten reproduzierbar sein muß, da in der Probe kein Standard enthalten ist, der Abweichungen des Injektionsvolumens oder aus der Probenvorbereitung korrigiert.

Bei der Erstellung eines ESTD-Reports erfolgt die Berechnung der Menge einer bestimmten Substanz in der unbekannten Probe in zwei Schritten:

1. Für diese Substanz wird eine passende Kalibrierkurve errechnet, die in den Dialogfeldern “Calibration Settings” oder “Calibration Curve” gewählt wurde.
2. Die Substanzmenge der Substanz in der unbekannten Probe wird mit der unten beschriebenen Formel berechnet. Diese Menge kann im Report erscheinen, oder zuvor durch Anwendung von Multiplikationsfaktor, Verdünnungsfaktor oder Probenmenge weiter bearbeitet werden, bevor sie im Report erscheint.

Die Formel des ESTD-Verfahrens zur Berechnung einer Absolutmenge der Substanz x lautet:

$$\text{Absolute Amt of x} = \text{Response}_x \cdot \text{RF}_x \cdot \text{M} \cdot \text{D}$$

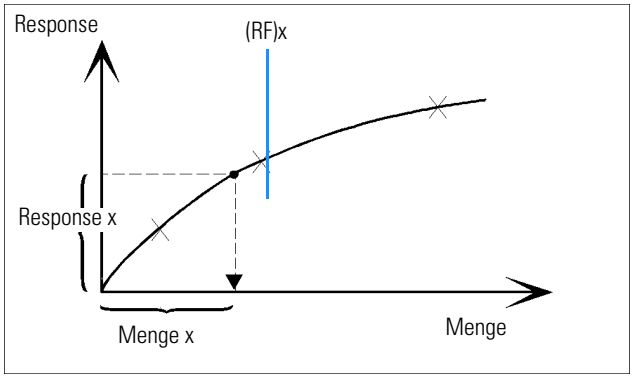
Erläuterung:

$Response_x$ ist der Response der Substanz im Peak x;

RF_x ist der Responsefaktor der Substanz x, gemäß: $\text{RF}_x = \frac{\text{Amount}_x}{\text{Response}_x}$

M ist der Multiplikationsfaktor.

D ist der Verdünnungsfaktor.



Multiplikations- und Verdünnungsfaktor werden den Dialogfeldern “Calibration Settings” oder “Sample Information” entnommen.

Wenn der Report ESTD% Report gewählt wird und die Probenmenge nicht Null ist, wird der relative Anteil (in %) einer Substanz mit der unten gezeigten Formel berechnet:

$$\text{Relative Amt of x} = \frac{(\text{Absolute Amt of x}) \cdot 100}{\text{Sample Amount}}$$

Erläuterung:

Absolute Menge von x wird analog zur oben gezeigten ESTD-Methode berechnet;

Probenmenge (Sample Amount) wird dem Feld “Sample Information” oder dem “Dialogfeld Calibration Settings” bei Einzelanalysen entnommen. Wenn die Probenmenge Null ist, wird der ESTD berechnet.

Berechnung von Norm%

In der Normierungsmethode werden Responsefaktoren auf die Peakflächen oder Peakhöhen angewendet, um Schwankungen der Detektorempfindlichkeit für verschiedene Probenbestandteile auszugleichen.

Der Report Norm% wird genauso berechnet wie der Report ESTD, außer, daß über einen zusätzlichen Rechenschritt die relativen Mengen anstelle der absoluten Mengen der Substanzen berechnet werden.

Der Report Norm% hat dieselben Nachteile wie die Reports Flächen% und Höhen%. Jede Änderung mit einem Einfluß auf die Gesamtpeakfläche hat auch einen Einfluß auf die berechneten Konzentrationen der Einzelsubstanzen. Der Report Normierung sollte nur eingesetzt werden, wenn alle interessierenden Substanzen eluiert bzw. migriert sind und integriert wurden. Die Herausnahme von Peaks aus dem Report Normierung verändert die Ergebnisse dieser Probe im Report.

Die Formel zur Berechnung der Norm% einer Substanz x lautet:

$$\text{Norm\% of x} = \frac{\text{Response}_x \cdot \text{RF}_x \cdot 100 \cdot \text{M} \cdot \text{D}}{\sum (\text{Response} \cdot \text{RF})}$$

Erläuterung:

$Response_x$ ist die Fläche (oder Höhe) des Peaks x;

RF_x ist der Responsefaktor;

$\sum (\text{Response} \cdot \text{RF})$ ist die Summe aller Produkte *(RESPONSE)(RF)* für alle Peaks einschließlich des Peaks x;

M ist der Multiplikationsfaktor

D ist der Verdünnungsfaktor.

Multiplikations- und Verdünnungsfaktor werden den Dialogfeldern “Calibration Settings” oder “Sample Information” entnommen.

Berechnungen mit internem Standard (ISTD)

Die Berechnung ISTD eliminiert die Nachteile des ESTD-Verfahrens durch Hinzufügen einer bekannten Menge einer Substanz in die Proben. Diese Substanz, der **interne Standard** wird sowohl zu Kalibrier- als auch zu unbekannten Proben gegeben.

Die Software verwendet die entsprechenden Responsefaktoren aus der in der Methode gespeicherten Kalibrierung. Mit der Konzentration des internen Standards und den Peakflächen oder Peakhöhen des Analysenlaufes berechnet die Software die Konzentration unbekannter Substanzen.

Die Substanz, die als interner Standard eingesetzt wird, sollte ein ähnliches Verhalten, wie die übrigen Substanzen haben, sowohl chemisch als auch in der Retentions- bzw. Migrationszeit, muß aber chromatographisch oder elektrophoretisch klar unterscheidbar sein.

Tabelle 8 **Das ISTD-Verfahren**

Vorteile	Nachteile
Variierende Probenmengen sind nicht kritisch.	Der interen Standard muß jeder Probe beigemengt werden
Drift des Analysengerätes wird durch internen Standard kompensiert	
Verluste in der Probenvorbereitung werden minimiert, wenn das chemische Verhalten von ISTD und Probe ähnlich ist	

Wenn das ISTD-Verfahren für Kalibrierungen mit nicht-linearer Charakteristik verwendet wird, muß sichergestellt werden, daß die Rechenmethode keine systematischen Fehler erzeugt. Bei Mehrpunktkalibrierungen muß die Menge des internen Standards konstant gehalten werden, das heißt in jedem Kalibrierlevel ist dieselbe Menge enthalten.

Bei einer Analyse mit internem Standard wird die Menge der interessierenden Substanz über das Responseverhältnis der beiden Peaks auf die Menge an internem Standard bezogen.

Bei einer ISTD-Kalibrierung mit zwei Läufen wird die Berechnung eines korrigierten Mengenverhältnisses einer bestimmten Substanz in einer unbekannten Probe mit folgenden Schritten durchgeführt:

Lauf 1: Kalibrierung

1 Die Kalibrierkurve wird erstellt, indem für jeden Punkt ein Mengenverhältnis und ein Responseverhältnis berechnet wird.

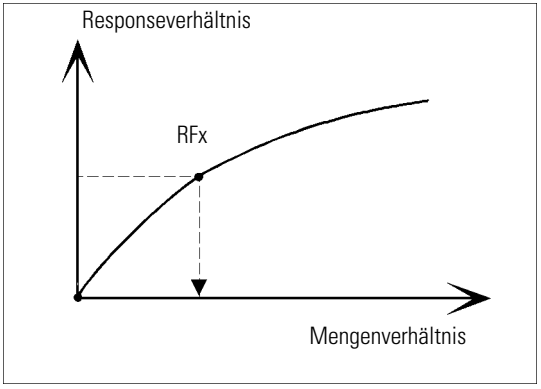
   Das Mengenverhältnis ist die Menge der Substanz dividiert durch die Menge des internen Standards für diesen Kalibrierpunkt.

   Das Responseverhältnis errechnet sich als Peakfläche der Substanz dividiert durch Peakfläche oder Höhe des internen Standards für diesen Kalibrierpunkt.

2 Die Kalibrierkurve wird auf der Basis der Anpassung (Fit) berechnet, die in den Dialogfeldern “Calibration Settings” oder “Calibration Curve” angegeben wurde.

$$RF_x = \frac{\text{Amount Ratio}}{\text{Response Ratio}}$$

Abbildung 32 **Mengenverhältnis**



Lauf 2: Unbekannte Probe

1 Zur Ermittlung des Responseverhältnisses der unbekannten Probe wird der Response der Substanz in der unbekannten Probe durch den Response des internen Standards in der unbekannten Probe dividiert.

2 Das Mengenverhältnis für die unbekannte Probe wird mit der Kurven-anpassung aus Schritt 2 oben und der Menge an internem Standard ermittelt.

Berechnung mit ISTD für kalibrierte Peaks

Die Gleichungen zur Berechnung der Menge einer kalibrierten Substanz x für eine Einpunktkalibrierung lauten:

$$\text{Response Ratio} = \frac{\text{Response}_x}{\text{Response}_{ISTD}}$$

$$\text{Actual Amt of x} = (\text{Response Ratio} \cdot RF_x) \cdot (\text{Actual Amount of ISTD}) \cdot M \cdot D$$

Erläuterung:

RF_x ist der Responsefaktor der Substanz x;

Die Menge des internen Standards in der Probe (*Actual Amt) ist der Wert, der in den Dialogfeldern "Calibration Settings" oder "Sample Info" eingegeben wurde*;

M ist der Multiplikationsfaktor;

D ist der Verdünnungsfaktor.

Bei gewähltem Reporttyp ISTD% wird die relative Menge (in %) der Menge x in der Probe mit folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Relative Amt of x} = \frac{(\text{Actual Amount of x}) \cdot 100}{\text{Sample Amount}}$$

Berechnung unkalibrierter Peaks mit ISTD

Zur Definition des Responsefaktors nicht identifizierter Peaks gibt es zwei Möglichkeiten.

1 Verwendung eines festen Responsefaktors With Rsp Factor, der im Dialog-feld “Calibration Settings” eingegeben wird. Sie können einen festen Responsefaktor durch Angabe einer ISTD-Korrektur korrigieren.

$$\text{Actual Amount of x} = RF_x \cdot (\text{Response Ratio})_x \cdot \text{Actual Amount of ISTD} \cdot M \cdot D$$

$$\text{Response Ratio} = \frac{\text{Response}_x}{\text{Response}_{ISTD}}$$

RF_x ist der Responsefaktor aus dem Dialogfeld “Calibration Settings”.

Sie können an diesen Formeln sehen, daß die Variationen des ISTD Response zur Korrektur in der Mengenbestimmung der unbekannten Substanz benutzt werden.

2 Verwendung eines kalibrierten Peaks. Damit wird sichergestellt, daß zur Quantifizierung aller Peaks derselbe Responsefaktor benutzt wird. Der Responsefaktor der ausgewählten Substanz und die unkalibrierten Peaks werden durch Rekalibrierungen korrigiert. Änderungen des Responsefaktors des kalibrierten Peaks führen zur gleichen Änderung des Responsefaktors des unbekannten Peaks. Falls eine Kalibriertabelle erstellt wurde, können Sie in “Using Compound” des Dialogfeldes “Calibration Settings” eine Substanz auswählen .

Die Gleichungen zur Berechnung der Menge einer Substanz eines unkalibrierten Peaks x sind oben aufgeführt.

9

Kalibrierung

Kalibrierung

In diesem Kapitel werden folgende Themen behandelt:

- Definition der Bergriffe
- Kalibriertabelle
- Kalibrierkurve
- Unbekannte Proben
- Kalibrierverfahren
- Gruppenkalibrierung
- Rekalibrierung

Definition der Begriffe

Kalibrierung

Eine Kalibrierung ist ein Verfahren zur Berechnung absoluter Substanzkonzentrationen. Hierzu werden spezielle Kalibrierproben (Standards) gemessen und ihr Response ermittelt. Die Kalibriertabelle wird auch zur Identifizierung verwendet. Siehe Kapitel7 “Peak Identification (Peakerkennung)”.

Substanz

Eine chemische Substanz kann bei einer Mehrfachsignalkalibrierung mehrere Peaks liefern, normalerweise einen Peak pro Signal. Bei einer Einfachsignalkalibrierung wird die Substanz nur auf einen Peak bezogen.

Kalibrierstufen (Level)

Eine Kalibrierstufe enthält die Kalibrierpunkte für die Kalibrierung einer Probenkonzentration an. Bei einer Mehrfachsignalkalibrierung können die Kalibrierpunkte auf mehrere Signale verteilt sein.

Kalibrierpunkt

Ein Kalibrierpunkt bezieht sich auf das Mengen/Response-Verhältnis eines Peaks auf der Kalibrierkurve.

Kalibrierprobe

Eine Kalibrierprobe, auch Kalibrierstandard oder Standardmischung genannt, ist eine Probe mit einem bekannten Gehalt der Substanz, die quantifiziert werden soll. In der Software wird die Kalibrierprobe als Injektion aus dem Kalibrierfläschchen bezeichnet.

Kalibrierproben sind bei den Anbietern von Feinchemikalien erhältlich oder können durch sorgfältiges Verdünnen einer bekannten Menge eines reinen Stoffes hergestellt werden. Die Menge des Stoffes in der Kalibrierprobe wird meist in Konzentrationseinheiten angegeben, oft in der Einheit ng/ml.

Kalibriertabelle

Eine Kalibriertabelle enthält Umrechnungen von Peakflächen oder Peakhöhen in Einheiten, die Sie selbst wählen können. Sie enthält eine Liste mit Retentions- bzw. Migrationszeiten aus einem Kalibrierlauf. Diese Retentions- bzw. Migrationszeiten werden mit denen des Analysenlaufes verglichen. Wenn eine Übereinstimmung vorliegt, wird für den Peak der Probe mit den Verfahren aus Kapitel7 “Peak Identification (Peakerkennung)” angenommen, daß es sich um dieselbe Substanz handelt wie in der Kalibriertabelle. Bei der Analyse oder der Reporterstellung werden die Mengen jedes eingetragenen Peaks dazu verwendet, die Mengen für das ausgewählte Kalibrierverfahren zu bestimmen. Die Art und Menge an Information, die zur Erstellung einer Kalibriertabelle notwendig ist, hängt von der Art des Kalibrierverfahrens ab.

Folgende Informationen sind zur Erstellung einer Kalibriertabelle erforderlich:

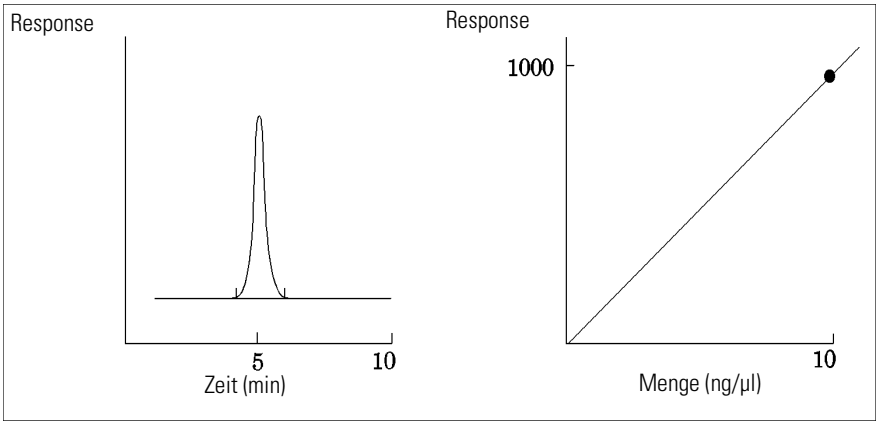
- Die Retentions- bzw. Migrationszeiten aller Komponenten der Kalibriermischung.
- Eine Mengenangabe für jede Komponente der Kalibriermischung in konsistenten Einheiten.

Kalibrierkurve

Eine Kalibrierkurve ist eine graphische Auftragung von Menge und Response (Peakfläche oder Peakhöhe) für eine Komponente aus einer oder mehreren Kalibrierproben.

Normalerweise wird ein Aliquot der Kalibrierprobe injiziert, ein Signal gemessen und der Response mit der Peakfläche oder Peakhöhe gemäß Abbildung 33 berechnet.

Abbildung 33 **Kalibrierprobe (10 ng/µl) Signal und Kalibrierkurve**



Mit der graphischen Darstellung der Kalibrierkurve wird ein *Korrelationskoeffizient* angegeben. Der Der Korrelationskoeffizient ist die Wurzel aus dem Regressionkoeffizienten und ist ein Maß für die Anpassung der Kalibrierkurve an die Datenpunkte. Der Koeffizient wird mit drei Dezimalstellen im Wertebereich von

0,000 bis1,000 angegeben.

mit:

0,000 = keine Übereinstimmung
1,000 = beste Übereinstimmung

Für jede Kalibrierstufe wird die *relative Abweichung* angezeigt. Sie wird mit folgender Formel berechnet:

$$\mathrm{relRES} = \frac{\mathrm{Response}_{\mathrm{calibrated}} - \mathrm{Response}_{\mathrm{calculated}}}{\mathrm{Response}_{\mathrm{calculated}}} \cdot 100$$

mit:

relRES= relative Abweichung in Prozent

Der berechnete Response entspricht einem Punkt der Kalibrierkurve.

Die *Standardabweichung* kann durch Wahl von “Print calibration table and curves” auf einigen Reports angegeben werden und wird mit folgender Formel berechnet:

$$\mathrm{ResSTD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\mathrm{Resp}_{\mathrm{calibratedi}} - \mathrm{Resp}_{\mathrm{calculatedi}})^2}{n-2}}$$

mit:

ResSTD = Standardabweichung

$\mathrm{Resp}_{\mathrm{calibratedi}}$ = kalibrierter Response im Punkt i

$\mathrm{Resp}_{\mathrm{calculatedi}}$ = berechneter Response im Punkt i

n= Anzahl der Kalibrierpunkte

Unbekannte Proben

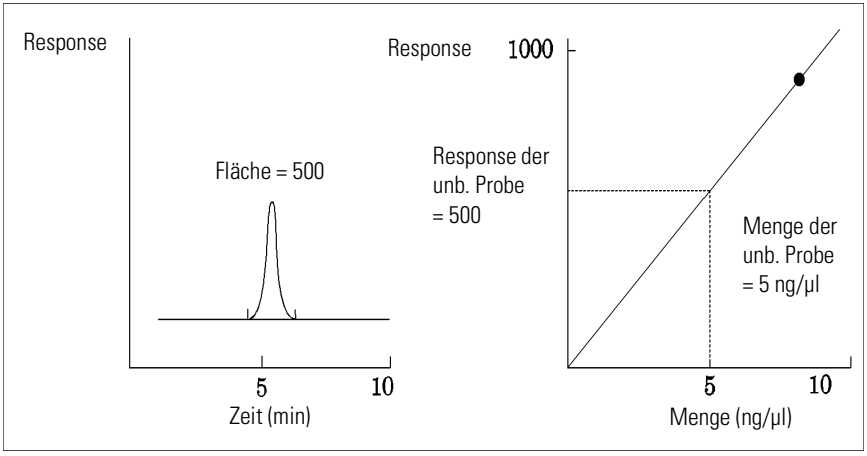
Eine unbekannte Probe ist eine Probe, die eine unbekannte Menge einer Substanz enthält, die quantifiziert werden soll.

Zur Ermittlung der Menge dieser Substanz in der Probe müssen Sie folgende Schritte durchführen:

- Erstellen einer Kalibrierkurve für diese Substanz;
- Ein Aliquot der unbekannten Probe injizieren und eine Analyse auf exakt dieselbe Weise ausführen wie bei der Kalibrierprobe;
- Ermitteln des Response, der als Fläche oder Höhe des Peaks entsprechend des unbekannten Gehaltes an der Substanz gemessen wird;
- Berechnen des Gehaltes der unbekannten Substanz mit Hilfe der Kalibrierkurve.

Wenn zum Beispiel für eine Probe unbekannten Gehaltes eine Fläche von 500 gemessen wird, wird mit der unter gezeigten Kalibrierkurve ein Gehalt der unbekannten Probe von 5 ng/ml ermittelt.Abbildung 34

Abbildung 34 **Signal einer unbekannten Probe und Kalibrierkurve**



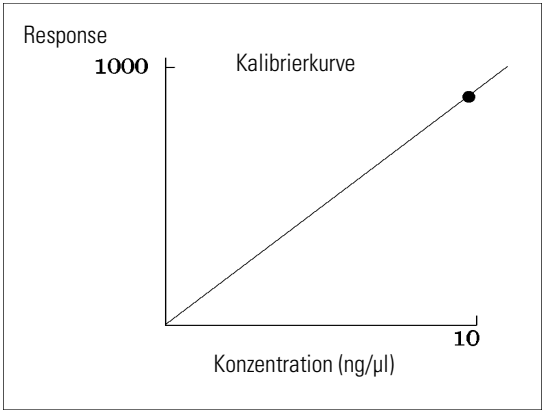
Kalibrierverfahren

Die ChemStation bietet die beiden Kalibrierverfahren Einpunktkalibrierung (Single-Level Calibration) und Mehrpunktkalibrierung (Multilevel Calibration) an.

Einpunktkalibrierung

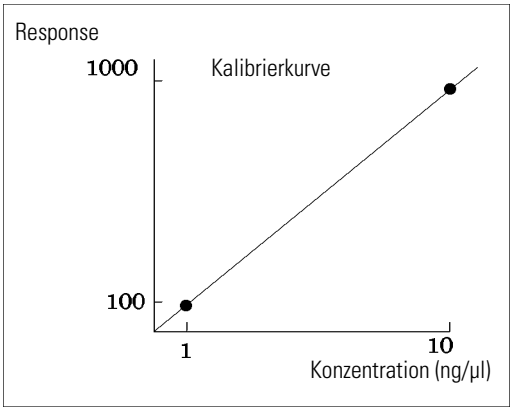
Die Kalibrierkurve aus Abbildung 35 enthält einen einzigen Kalibrierpunkt. Einer Einpunktkalibrierung liegt die Annahme zugrunde, daß der Detektorresponse über den interessierenden Konzentrationsbereich linear ist. Der Responsefaktor einer bestimmten Substanz wird durch die inverse Steigung der Kalibrierkurve durch Meßpunkt und Koordinatenursprung bestimmt. Nachteile der Einpunktkalibrierung sind die Annahmen von Detektorlinearität und Verlauf der Kurve durch den Ursprung. Dies stimmt nicht immer und kann daher zu unkorrekten Ergebnissen führen.

Abbildung 35 **Einpunktkalibrierkurve**



Zur Erzielung korrekter Ergebnisse sollte eine Kalibrierkurve mindestens zwei Kalibrierpunkte aufweisen. Diese Kalibrierpunkte sollten die in der Probe erwarteten Mengen umschließen, d. h. darüber und darunter liegen.

Abbildung 36 **Zweipunktkalibrierkurve**



Wenn Sie zum Beispiel eine Probe vermessen wollen, deren Gehalt im Bereich von 1 bis 10 ng/ml erwartet wird, sollte die Kalibrierkurve mindestens die beiden Punkte gemäß Abbildung 36 aufweisen.

Bestimmungsgrenzen

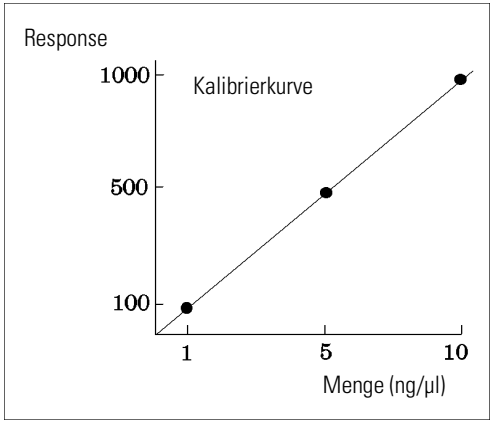
Die ChemStation erlaubt Ihnen die Definition von Bestimmungsgrenzen in absoluten Einheiten für jede Komponente.

Mehrpunktkalibrierung

Mehrpunktkalibrierungen können bei nichtlinearem Verhalten einer Substanz im kalibrierten Bereich oder zur Bestätigung der Linearität eingesetzt werden. Jeder Kalibrierpunkt wird mit einer Probe einer bestimmten Konzentration gewonnen. Die Kalibrierproben sollen mit Konzentrationen angesetzt werden, die den Bereich der erwarteten Probenkonzentrationen umschließen. Dann ist es möglich, Änderungen des Detektorresponse in Abhängigkeit von der Konzentration zu berücksichtigen und die Reponsefaktoren dafür zu berechnen.

Diese Mehrpunktkalibrierkurve hat drei Kalibrierpunkte und eine lineare Kurvenanpassung, die durch den Koordinatenursprung verläuft. Eine solche lineare Anpassung ähnelt der Einpunktkalibrierung insofern, als ebenfalls ein lineares Verhältnis zwischen Detektorresponse und Konzentration angenommen wird. Der Unterschied besteht darin, daß die Geradensteigung durch die beste Anpassung an die Kalibrierpunkte erhalten wird.

Abbildung 37 **Mehrpunktkalibrierkurve mit drei Kalibrierpunkten**



Die zugehörige Kalibriertabelle, die tabellarische Zusammenstellung der Kalibrierdaten, wird in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9 **Kalibriertabelle**

Kalibrierstufe	Menge (ng/ml)	Response (Flächeneinheiten)
2	5	500
3	10	1000

In diesem Beispiel wurden die Kalibrierproben zur Erzeugung der drei Kalibrierpunkte mit 1, 2 und 3 bezeichnet.

Kalibrierbereiche

Jede Mehrpunktkalibrierung ist über den Konzentrationsbereich gültig, der durch die Kalibrierproben vorgegeben wurde. Eine Extrapolation der Kalibrierkurve, besonders im nichtlinearen Fall, ist bestenfalls eine Näherung. Der gültige Konzentrationsbereich kann für jede Substanz im Dialogfeld “Compound Details” definiert werden. Jeder Eintrag besteht aus einer Ober- und einer Untergrenze. Bei Überschreiten dieser Grenzen wird ein Hinweis in den Report eingefügt.

Anpassungsverfahren an Kalibrierkurven

Für die Mehrpunktkalibrierung sind verschiedene Anpassungsverfahren verfügbar.

- Punkt zu Punkt
- Linear
- Logarithmisch
- Potenziert
- Exponentiell
- Quadratisch
- Kubisch
- Mittelwertbildung (Response/Menge)

Nichtlineare Anpassungsverfahren

In einigen Fällen ändert sich der Detektorresponse nicht linear mit der Probenkonzentration. In diesen Fällen ist eine Kalibrierung auf der Basis einer linearen Regression unzulässig und es sollte eine Mehrpunktkalibrierung eingesetzt werden.

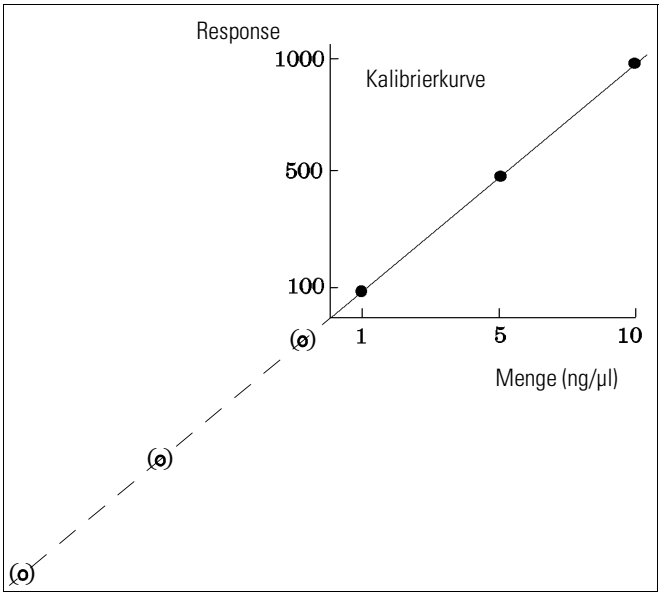
Behandlung des Koordinatenursprunges

Es stehen vier Möglichkeiten zur Einbeziehung des Koordinatenursprunges zur Verfügung:

- Ursprung ignorieren
- Ursprung einbeziehen
- Verlauf durch Koordinatenursprung erzwingen
- Mit Koordinatenursprung verbinden

Um zu erzwingen, dass der Koordinatenursprung in der Kalibrierkurve enthalten ist, werden die Kalibrierpunkte am Ursprung vom ersten Quadranten in den dritten gespiegelt. Die Verwendung aller Punkte für die Regressionsberechnung sichert, dass die Kalibrierkurve durch den Ursprung läuft. Dies wird auch in Abbildung 38 auf Seite 188 erklärt.

Abbildung 38 **Verlauf durch Koordinatenursprung erzwingen**



Weitere Informationen zu Kurvenanpassungen in Kalibrierungen und zur Behandlung des Achsenabschnittes finden Sie in Ihrer *Online-Hilfe*.

Gewichtung von Kalibrierpunkten

Bei der Erstellung Ihrer Standardkalibrierkurve können Sie eine relative Gewichtung der verschiedenen Kalibrierpunkte angeben. Folgende Optionen können zur Gewichtung gewählt werden:

Gewichtung	Description
Gleich	Alle Kalibrierpunkte der Kurve werden gleich gewichtet.
Linear (Menge)	Ein Kalibrierpunkt der Menge x erhält die Gewichtung 1/x, normiert auf die niedrigste Konzentration. So ergibt sich für den höchsten Gewichtungsfaktor der Wert 1. Die Normierung wird über die Multiplikation der Gewichtung mit der niedrigsten Konzentration durchgeführt. Beispielsweise resultiert die Gewichtung für einen Kalibrierpunkt der Menge x aus $1/x \cdot a$, wobei a die kleinste Menge Kalibriersubstanz darstellt, die in den Kalibrierstandards enthalten ist. Wenn der Ursprung einbezogen ist, wird ihm der

Mittelwert der Gewichtungen der anderen Kalibrierpunkte zugewiesen.

Linear (Resp) Ein Kalibrierpunkt mit der Response y hat die Gewichtung 1/y auf die niedrigste Response normalisiert, so dass der größte Gewichtungsfaktor 1 ist. Die Normalisierung geschieht durch Multiplikation der Gewichtung mit der kleinsten Response. Beispielsweise ist die Gewichtung eines Kalibrierpunktes mit der Menge y $(1/y) - b$, wobei b die Reponse bezogen auf die kleinste Menge Kalibriersubstanz, die in den Kalibrierstandards enthalten ist, darstellt.
Wenn der Ursprung einbezogen ist, wird ihm der Mittelwert der Gewichtungen der anderen Kalibrierpunkte zugewiesen.

Quadratisch (Menge) Ein Kalibrierpunkt der Menge x erhält die Gewichtung $1/x^2$, normiert auf die niedrigste Konzentration. So ergibt sich für den höchsten Gewichtungsfaktor der Wert 1. Die Normierung wird über die Multiplikation der Gewichtung mit der niedrigsten Konzentration durchgeführt. Beispielsweise resultiert die Gewichtung für einen Kalibrierpunkt der Menge x aus $1/x^2 \cdot a^2$, wobei a die kleinste Menge Kalibriersubstanz darstellt, die in den Kalibrierstandards enthalten ist.

Quadratisch (Resp) Ein Kalibrierpunkt mit der Response y hat die Gewichtung $1/y^2$ auf die niedrigste Response normalisiert, so dass der größte Gewichtungsfaktor 1 ist. Die Normalisierung geschieht durch Multiplikation der Gewichtung mit der kleinsten Response. Beispielsweise ist die Gewichtung eines Kalibrierpunktes mit der Response y $1/y^2 \cdot b^2$, wobei b die Reponse bezogen auf die kleinste Menge Kalibriersubstanz, die in den Kalibrierstandards enthalten ist, darstellt.

 # kalibriert Jeder Kalibrierpunkt erhält eine Gewichtung entsprechend der vorliegenden Anzahl an Rekalibrierungen für diesen Punkt. Es wird keine Normierung durchgeführt.

Quadratische Kalibrierpunkt-Gewichtung kann z.B. zur Anpassung bei streuenden Kalibrierpunkten verwendet werden. Sie führt dazu, dass

Kalibrierpunkte, die näher am Ursprung liegen und somit genauer bestimmt werden können, höher gewichtet werden als Kalibrierpunkte, die weiter vom Ursprung entfernt sind und eher streuen können.

Sie sollten Ihre Entscheidung bezüglich der Kalibrierpunktgewichtung von den Anforderungen Ihrer Methode abhängig machen.

Gruppenkalibrierung

Gruppenkalibrierungen können für Substanzen verwendet werden, bei denen für einzelne Komponenten keine Konzentrationen bekannt sind, sondern nur die Konzentrationen einer Gruppe von Komponenten. Ein Beispiel dafür sind Isomere. Es werden vollständige Substanzgruppen kalibriert; dabei kommen folgende Formeln zum Einsatz:

Kalibrierung

$$\mathrm{Conc}_{AB} = \mathrm{RF}_A \cdot \mathrm{Response}_A + \mathrm{RF}_B \cdot \mathrm{Response}_B$$

mit:

$Conc_{AB}$ ist die Konzentration der Substanzgruppe, die aus Substanz A und B besteht

$Response_A$ ist die Fläche (bzw. Höhe) der Substanz A

RF_A ist der Responsefaktor

Dabei werden für die Substanzen einer Gruppe dieselben Responsefaktoren vorausgesetzt:

$$\mathrm{RF}_A = \mathrm{RF}_B$$

Folglich wird die Konzentration einer Substanz aus einer Substanzgruppe wie folgt berechnet:

$$\mathrm{Conc}_A = \frac{\mathrm{Conc}_{AB} \cdot \mathrm{Resp}_A}{\mathrm{Resp}_A + \mathrm{Resp}_B}$$

Peakaddition

Die Tabelle der Peaksummen wird für einige Anwendungen für die petrochemische oder pharmazeutische Industrie geliefert und läßt sich folgendermaßen sehr wirksam einsetzen:

- Addition der Peakflächen, die innerhalb eines benutzerdefinierten Bereiches liegen
- Addition der Flächen eines Peakbereiches und Berechnung mit einem einzigen Multiplikator
- Addieren Sie die Flächen aller Peaks, die denselben Namen haben.

Die Tabelle der Peaksummen ähnelt in mancher Hinsicht der Kalibriertabelle. Wie die Kalibriertabelle ist sie mit der aktuellen Methode verknüpft.

HINWEIS Sie müssen erst eine Kalibriertabelle für eine Analyse erstellen, bevor Sie eine Tabelle der Peaksummen anlegen können.

Rekalibrierung

Was ist Rekalibrierung?

Unter Rekalibrierung versteht man die Aktualisierung eines Kalibrierpunktes auf einer Kalibriergeraden. Bei einer Rekalibrierung wird eine Probe vermessen, die dieselben Substanzen in denselben Mengen enthält wie die Originalprobe. Durch Vermessen dieser Kalibrierprobe erhalten Sie aktualisierte Responsefaktoren und Retentions- bzw. Migrationszeiten. Sie können auch eine Mittelwertbildung aus mehreren Läufen zur Gewichtung der Responsefaktoren wählen.

Warum ist die Rekalibrierung wichtig?

Die meisten Kalibrierungen sind nur für eine beschränkte Zeit gültig, weil sich die chromatographischen bzw. elektropherographischen Rahmenbedingungen verändern. Die Rekalibrierung dient zur Sicherstellung der Genauigkeit der Quantifizierung. Falls zum Beispiel eine Kalibriertabelle zur quantitativen Bestimmung von Coffein angelegt wurde, muß nach einem etwaigen Säulen- bzw. Kapillarenwechsel eine Rekalibrierung durchgeführt werden. Auch wenn es sich um denselben Säulen- bzw. Kapillarentyp handelt, besitzt die Säule bzw. Kapillare nicht genau dieselben Eigenschaften, wie die, mit der die Kalibriertabelle für Coffein erstellt wurde. Daher sollten die Stufen der Kalibriertabelle mit der neuen Säule bzw. Kapillare nochmals ermittelt werden, bevor die unbekannte Probe auf ihren Coffeingehalt untersucht wird. Durch diese Vorgehensweise werden die Proben unter denselben Bedingungen analysiert.

Manuelle Rekalibrierung

Sie können Informationen für Peakkalibrierungen auch manuell eingeben und die Kalibriertabelle mit Hilfe der Schaltfläche "Manual Setup" im Dialogfeld "New Calibration Table" normieren. Normalerweise wird eine neue Kalibriermethode erstellt, indem man eine Standardmischung analysiert, eine Kalibriertabelle erstellt und die Menge aller kalibrierter Peaks angibt, um die Responsefaktoren zu berechnen. Für einige Anwendungen, z.B. in der petrochemischen Industrie, ist dieser Ansatz sehr ineffizient, da dieselben Substanzen seit Jahren untersucht werden und die Responsefaktoren der verschiedenen Substanzen für verschiedene Detektoren bereits vorliegen.

In diesem Fall wird die Kalibriertabelle manuell erstellt, indem die Peaks und ihre Responsefaktoren in die Kalibriertabelle eingetragen werden. Außerdem muß die Methode mit einem Standard, der mindestens einen Referenzpeak enthält, rekalibriert und Abweichung (%) aktualisiert werden.

Rekalibrierung mit Peakaddition

Wenn eine Rekalibrierung durchgeführt wird, werden die Bereiche für die Retentionszeiten in der Peaksummen-Tabelle vor der eigentlichen Rekalibrierung aktualisiert. Rekalibrierungen der Peaksumme werden auf diese Weise durchgeführt, um sicherzustellen, daß Abweichungen in die Zeitberechnungen aufgenommen werden.

Optionen für die Rekalibrierung

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die Werte für den Response in der Kalibriertabelle durch neue Kalibrierdaten zu ersetzen.

Mittelwert (Average)

Der Mittelwert aus allen Ergebnissen der Kalibrierläufe wird nach folgender Formel berechnet

$$\text{Response} = \frac{n \cdot \text{Response} + \text{MeasResponse}}{n + 1}$$

mit

n = Anzahl der vorherigen Kalibrierungen
MeasResponse = gemessener Response

Fließender Mittelwert (Floating Average)

Aus allen Kalibrierläufen wird ein gewichteter Mittelwert berechnet. Die neue Gewichtung wird im Dialogfeld “Recalibration Settings” eingetragen.

$$\text{Response} = \left(1 - \frac{\text{Weight}}{100}\right) \cdot \text{Response} + \left(\frac{\text{Weight}}{100}\right) \cdot \text{MeasResponse}$$

mit

Prozentanteil= neue Gewichtung für den Response in den Einstellungen für die Rekalibrierung

MeasResponse = gemessener Response

Ersetzen (Replace) Die alten Werte für den Response werden durch die neuen Werte ersetzt.

Möglichkeiten der Rekalibrierung

Mit der ChemStation Software können Rekalibrierungen auf zwei Arten durchgeführt werden. Sie können interaktiv oder automatisch während einer Sequenz rekalibrieren. Die interaktive Rekalibrierung ist die direkte Durchführung aller Rekalibrierschritte mit der ChemStation nach der Injektion einer oder mehrerer Proben. Rekalibrierungen mit einer Sequenz erfordern die Angabe des Rekalibrierzeitpunktes, die Rekalibrierung wird von der Software dann automatisch vorgenommen. Für weitere Informationen schlagen Sie bitte unter “Automatische Rekalibrierung” on page 212 nach.

Weitere Informationen über die Durchführung einer Rekalibrierung mit Hilfe der Software finden Sie im Abschnitt “How To” des Hilfe-Systems oder im integrierten Tutorial.

Rekalibrierung unidentifizierter Peaks

Es gibt drei Möglichkeiten zur Rekalibrierung unidentifizierter Peaks.

Keine Rekalibrierung

Wenn ein Peak der Kalibriertabelle bei der Ausgabe der Integrationsergebnisse nicht identifiziert werden kann, wird die Kalibrierung abgebrochen. Wenn dies innerhalb einer Sequenz auftritt, wird die Sequenz ebenfalls abgebrochen.

Partielle Rekalibrierung

Diese Möglichkeit gestattet die Rekalibrierung der identifizierten Peaks. Fehlende Peaks führen nicht zum Abbruch der Kalibrierung, aber zu einem entsprechenden Hinweis im Report.

Rekalibrierung aller Retentions- bzw. Migrationszeiten

Diese Möglichkeit gestattet die Rekalibrierung von Retentions- bzw. Migrationszeit aller identifizierten und unidentifizierten Peaks. Dies geschieht mit Hilfe der Retentions- bzw. Migrationszeiten aller identifizierten

Peaks. Die Responsefaktoren unidentifizierter Peaks werden nicht aktualisiert.

10

Automatisierung

Automatisierung

In diesem Kapitel werden folgende Themen behandelt:

- Was ist Automatisierung?
- Was ist eine Sequenz?
- Mit Sequenzen arbeiten
- Sequenztypen
- Sequenzen editieren
- Was geschieht während der Ausführung einer Sequenz? und
- Anpassung von Sequenzen

Was ist Automatisierung?

Unter Automatisierung versteht man die unbeaufsichtigte Ausführung mehrerer Analysen.

Der Sequenzteil der ChemStation Software ermöglicht Ihnen die automatische Datenerfassung, Datenauswertung und Reporterstellung.

Was ist eine Sequenz?

Eine Sequenz ist eine Folge von Anweisungen zur Automatisierung der Analyse von Proben.

Eine Sequenz kann eine Probe automatisch injizieren und die Daten gemäß der gewählten Methode erfassen und auswerten. Jede Probe in einer Sequenz kann mit einer anderen analytischen Methode vermessen werden. Daher können unterschiedliche Parametersätze für die chromatographischen oder elektrophoretischen Bedingungen und in der Datenauswertung verwendet werden.

Sequenzparameter

Das Dialogfeld “Sequence Parameters” enthält Informationen, die für alle Proben einer Sequenz gleich bleiben. Sie können in diesem Dialogfeld folgende Parameter einstellen:

- Informationen zum Verzeichnis der Datensätze und zum Anwender (der Anwendername aus dem Dialogfeld “Operator Name” wird angezeigt)
- Angaben zur Ausführung der Sequenz durch Wahl von Parametern im Dialogfeld “Part of Methods to Run”.

Hier können zum Beispiel folgende Eingaben gemacht werden:

- Durchführung der Sequenz entsprechend der RunTime Checkliste
- Nur die Datenerfassung durchführen
- Nur die Datenauswertung durchführen

Wenn die Option Datenauswertung (Reprocessing) gewählt wird, können Sie zwischen den Probendaten, die bei der ursprünglichen Auswertung der Proben gewählt wurden oder aktualisierten Daten wählen. Dies geschieht durch Aktivieren des Ankreuzkästchens “Use Sequence Table” oder Eingabe der Daten in die Sequenztabelle.

- Mit dem Parameter “Shutdown” kann festgelegt werden, was nach Ende der Sequenz geschehen soll
- Legen Sie fest, ob Strichcodes verwendet werden sollen und was bei einer Nichtübereinstimmung der Strichcodes geschehen soll; dies setzt voraus, daß Sie einen Strichcodeleser an Ihrem System installiert haben.

Sequenztabelle

In der Sequenztabelle werden die Methoden zur Analyse der Proben und die Reihenfolge der Probenfläschchen in der Messung festgelegt. Diese Tabelle enthält auch Informationen zu jeder Probe, einschließlich eines Namens und Parametern zur Quantifizierung und Rekalibrierung.

Das Gruppenfeld “Injector” wird beim Einsatz mit Geräten angezeigt, die Dual Sampling unterstützen, z. B. ein GC. Die Wahl von Front oder Back zeigt die Zeilen in der Sequenztabelle neben dem aktiven Status dieses Injektors an.

Eine Beschreibung der einzelnen Spalten dieser Tabelle und das Zusammenwirken mit Informationen aus der Methode finden Sie in der Online-Hilfe.

Erstellen einer Sequenz

Verwenden Sie die Sequenztabelle zur Festlegung der Proben, Methoden und Probenfläschchen in der Sequenz. Die Sequenztabelle zeigt jede Probe der Sequenz in der Reihenfolge, in der die Messung erfolgt und enthält die notwendigen Informationen bezüglich Probenfläschchen, Methode und Kalibrierung für jede Probe.

Verwenden der Schaltfläche “Insert Vial Range”

Falls Sie sehr viele Proben zur Vermessung mit einer Methode haben, können Sie diese schnell in die Sequenztabelle einfügen, indem Sie die Funktion “Insert Vial Range” (Probenbereich einfügen) nutzen. Diese Funktion kopiert Methodenname, Bereich der Probenfläschchen, Anzahl der Injektionen pro Probenfläschchen und nach Wunsch die Probenmenge, Menge des internen Standards, Multiplikations- und Verdünnungsfaktor. Das System fügt die erforderlichen Informationen für jede Probe innerhalb dieses Bereiches in die Sequenztabelle ein.

Verwenden der Schaltfläche “Append Line”

Wenn Sie eine leere Zeile an die Sequenz anhängen wollen, wählen Sie die Schaltfläche “Append Line” an.

Arbeiten mit Sequenzen

Sequenzen werden im Menü “Sequence” aufgerufen und erstellt. Sequenzen werden in derselben Weise erstellt und gespeichert wie Methoden. Beim Speichern einer Sequenz wird eine Datei mit der Erweiterung .S abgelegt. Wenn Sie die Sequenz erneut editieren oder laden wollen, erfolgt der Zugriff mit “Load Sequence” im Menü “Sequence”.

Vorzugsproben (Priority Samples)

Eine aktuell laufende Sequenz kann nach Abschluß einer aktuell laufenden Methode unterbrochen werden. Eine dazwischengeschobene Vorzugsprobe kann dann mit derselben oder einer anderen Methode vermessen werden. Die Sequenz wird anschließend mit derjenigen Probe fortgesetzt, mit der die Sequenz auch ohne Unterbrechung weitergelaufen wäre.

Durchführung von Sequenzen mit Kontrollproben

Eine Probe kann im Feld “Sample Type” der Sequenztabelle als Kontrollprobe festgelegt werden. Die Methode, mit der diese Probe abgearbeitet wird, muß eine Kalibriertabelle besitzen, in der Grenzwerte für eine der enthaltenen Substanzen eingegeben sind. Wenn die festgelegten Grenzwerte für die Kontrollprobe überschritten werden, wird die Sequenz gestoppt und eine Meldung in das Logbuch geschrieben. Wenn Sie einen der Reportarten der ChemStation verwenden, werden die Grenzwerte für die Kontrollproben in den Analysenreport mit aufgenommen. Weitere Informationen über das Festlegen einer Sequenz mit Kontrollproben finden Sie im Abschnitt “How To” Ihres Online-Hilfe Systems.

Stoppen einer Sequenz

Der aktuelle Lauf wird vor dem Stop der Sequenz vollständig durchgeführt. Eine gestoppte Sequenz kann nicht mehr fortgesetzt werden.

Abbrechen einer Sequenz

Die Funktion “Abort” unterbricht eine Sequenz sofort.

Pausieren einer Sequenz

Während einer Pause im Sequenzablauf können die Namen von Sequenztabelle und Datensätzen nicht geändert werden. Sie können in der Sequenztabelle nur die Zeilen, die noch nicht bearbeitet wurden oder in der aktuellen Zeile die Nummer des Probenfläschchens verändern. Sie können bei anstehenden Analysen Zeilen hinzufügen, löschen und verändern.

Es könnte zum Beispiel erforderlich sein, zu einer aktiven Sequenz weitere Proben hinzuzufügen. Sie können die Sequenz editieren und eingeben, daß diese Proben im Anschluß an die aktuell laufende Sequenz bearbeitet werden.

Ausführen einer Teilsequenz

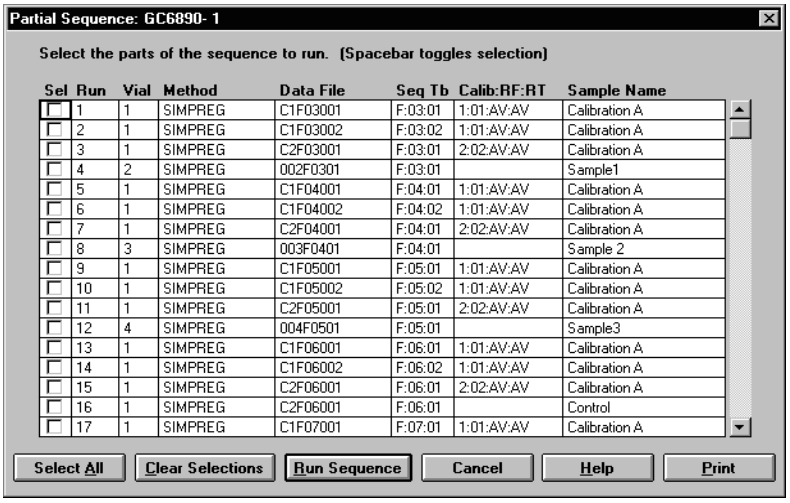
Eine bereits erstellte Sequenztabelle kann durch Wahl von “Partial Sequence” im Menü “Sequence” auch teilweise ausgeführt werden. Das System zeigt das Dialogfeld “Partial Sequence” an und ermöglicht Ihnen die Auswahl einzelner Proben zur Analyse.

Jede Zeile des Dialogfeldes “Partial Sequence” entspricht einem Analysenlauf. Für jeden Analysenlauf werden Probenfläschchen, Methode, Datensatz- und Probenname angegeben. Zusätzlich stehen in den Spalten „Seq Tbl" und „Calib:RF:RT" kodierte Informationen zur Sequenztabelle und den Kalibrierproben. In der Online-Hilfe finden Sie die Erläuterungen dieser Kodierungen.

Über die Druckschaltfläche können Sie die Teilsequenz ausdrucken.

Das folgende Dialogfeld "Partial Sequence" wird erstellt, wenn die Methode "SimpReg Method" und die Sequenztabelle, die unter Tabelle 14 und Tabelle 15 dargestellt ist, gewählt werden. Die Proben 1, 2, 4, 5 und 8 sind für eine Bearbeitung markiert.

Abbildung 39 **Dialogfeld für eine Teilsequenz**



Sel	Run	Vial	Method	Data File	Seq Tb	Calib:RF:RT	Sample Name
☐	1	1	SIMPREG	C1F03001	F:03:01	1:01:AV:AV	Calibration A
☐	2	1	SIMPREG	C1F03002	F:03:02	1:01:AV:AV	Calibration A
☐	3	1	SIMPREG	C2F03001	F:03:01	2:02:AV:AV	Calibration A
☐	4	2	SIMPREG	002F0301	F:03:01		Sample1
☐	5	1	SIMPREG	C1F04001	F:04:01	1:01:AV:AV	Calibration A
☐	6	1	SIMPREG	C1F04002	F:04:02	1:01:AV:AV	Calibration A
☐	7	1	SIMPREG	C2F04001	F:04:01	2:02:AV:AV	Calibration A
☐	8	3	SIMPREG	003F0401	F:04:01		Sample 2
☐	9	1	SIMPREG	C1F05001	F:05:01	1:01:AV:AV	Calibration A
☐	10	1	SIMPREG	C1F05002	F:05:02	1:01:AV:AV	Calibration A
☐	11	1	SIMPREG	C2F05001	F:05:01	2:02:AV:AV	Calibration A
☐	12	4	SIMPREG	004F0501	F:05:01		Sample3
☐	13	1	SIMPREG	C1F06001	F:06:01	1:01:AV:AV	Calibration A
☐	14	1	SIMPREG	C1F06002	F:06:02	1:01:AV:AV	Calibration A
☐	15	1	SIMPREG	C2F06001	F:06:01	2:02:AV:AV	Calibration A
☐	16	1	SIMPREG	C2F06001	F:06:01		Control
☐	17	1	SIMPREG	C1F07001	F:07:01	1:01:AV:AV	Calibration A

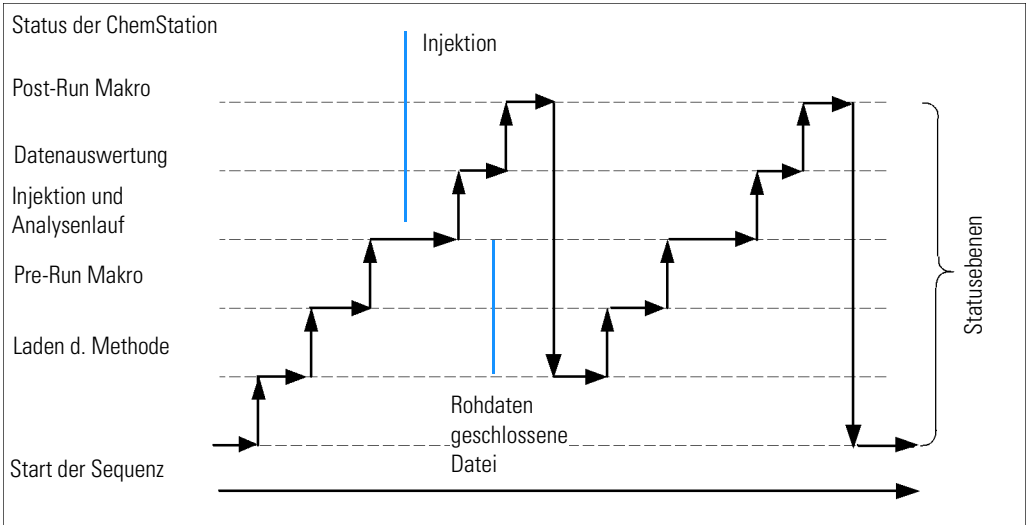
Logbuchdatei einer Sequenz

Es wird eine Logbuchdatei angelegt, die alle Ereignisse enthält, die während der Ausführung der Analyse auftraten. Dies ist zur Fehlererkennung bei unbeobachtet ausgeführten Sequenzen, zum Beispiel über Nacht, von Nutzen. Die Logbuchdatei trägt stets die Dateinamenerweiterung .log. Die Logbuchdatei wird in dem Verzeichnis abgelegt, in dem sich die Datensätze der Sequenz befinden.

Was geschieht während der Ausführung einer Sequenz?

- Bei vorhandenem Autosampler sucht die ChemStation Software zuerst die Probe im Autosampler gemäß der Zahl in der Spalte “Vial”.
- Die Methodenparameter werden an die Analysengeräte weitergegeben.
- Das Makro vor dem Analysenlauf (Prerun Macro) wird ausgeführt.
- Die Probe wird entweder manuell oder automatisch injiziert.
- Die Datenauswertung der Methode wird durchgeführt. Dies umfaßt Integration, Quantifizierung, Reporterstellung und eventuelle Makros des Anwenders.
- Das Makro nach dem Analysenlauf (Postrun Macro) wird ausgeführt.
- Während des gesamten Vorganges verfolgt die ChemStation den Fortschritt der Sequenz in Echtzeit und legt eine Logbuchdatei an.

Abbildung 40 **Statusfolge einer Sequenz**



Vergabe von Dateinamen in einer Sequenz

In einer Sequenz können Dateinamen folgendermaßen vergeben werden:

- automatisch
- manuell
- mit Prefix-Zähler

Sie sollten auf jeden Fall ein Unterverzeichnis angeben, in dem die Datensätze gemäß Abschnitt “Sequenzparameter” auf Seite 201 gespeichert werden sollen.

Automatische Vergabe von Dateinamen in einer Sequenz

Probenfläschchen

Beispiel: 017-0103.D

mit:

- Die ersten drei Stellen nennen die Nummer des Probenfläschchens, hier 017.
- Die vierte Stelle ist bei LC und Elektrophorese ein Trennstrich (-). In der Gaschromatographie erscheinen entweder F (für Front) oder B (für Back).
- In der fünften und sechsten Stelle steht die Zeilennummer der Sequenz, die die verwendete Methode vorgibt, hier 01 für die erste Zeile der Sequenz.
- In der siebten und achten Stelle stehen die Injektionsnummern dieses Probenfläschchens mit dieser Methode, hier 03 für die dritte Injektion.

Nullproben als Analysenläufe

Beispiel: NV--0499.D

mit:

- NV steht für “no vial” (kein Probenfläschchen)
- - ist der Trennstrich
- 0499 ist die 99-^{te} Nullprobe aus der Sequenzzeile 4.

Manuelle Vergabe von Dateinamen

Eine Spalte in der Sequenztabelle hat die Beschriftung “Datafile”. Wenn hier nichts eingetragen wird, werden die Dateinamen nach einer der anderen Möglichkeiten (automatisch oder über Prefix-Zähler) vergeben. Wird in die Spalte mit der Beschriftung “Datafile” irgendein Text eingegeben, verwendet die ChemStation diesen Text als Dateinamen für den Analysenlauf.

Wenn in einer Zeile mit einem manuell vergebenen Dateinamen für ein Probenfläschchen mehrere Injektionen vorgesehen sind, schneidet die ChemStation automatisch Buchstaben vom eingegebenen Namen ab und hängt die Injektionsnummer an. Dies verhindert, daß derselbe Dateiname für mehrere Injektionen vergeben wird.

Vergabe von Dateinamen über einen Prefix-Zähler

Wenn Sie für die Benennung von Datensätzen den Prefix-Zähler verwenden, erstellt die ChemStation für jede Analyse einen Namen. Bei Geräten, die Analysen mit Doppelsignalen ermöglichen, wie z.B. dem GC, erstellt die ChemStation für jedes Signal einen Dateinamen.

Die ChemStation erstellt die Dateinamen aus einem vom Anwender eingegebenen Prefix (bestehend aus 1 bis 7 alphanumerischen Zeichen) und einem Zähler (8 weniger der Anzahl der Zeichen im Prefix).

Im unten aufgeführten Beispiel ist TEST der Prefix und 0001 der Zähler.

TEST0001

Der Zähler wird mit jedem erstellten Datensatz um eins erhöht.

Aktionen nach der Sequenz

Sie können angeben, was nach dem Ende der planmäßigen Sequenzausführung oder wenn die ChemStation während der Ausführung einen Fehler entdeckt, geschehen soll. Für LC-Sequenzen ermöglicht das Ankreuzkästchen “Post-Sequence Cmd/Macro” des Dialogfeldes “Sequence Parameters” folgende Wahlmöglichkeiten:

- Aktivieren eines STANDBY-Status mit ausgeschalteten Pumpen und Lampen
- Aktivieren eines LAMPOFF-Status mit ausgeschalteten Lampen (nur LC und CE)
- Aktivieren eines PUMPOFF-Status mit ausgeschalteten Pumpen (nur LC und CE)
- Aktivieren eines SHUTDOWN-Makros oder Modifikation von SHUTDOWN.MAC zur Festlegung bestimmter Operationen.

  So können Sie Ihr System nach der Ausführung der Sequenz abschalten. Das Makro SHUTDOWN kann auch zum Reduzieren oder Abschalten der Flußrate benutzt werden.

Im Dialogfeld “Sequence Parameters” können Sie die Ausführung eines beliebigen Makros festlegen, indem Sie dessen Namen im Feld “Post-Sequence Cmd/Macro” eintragen und das Kontrollkästchen aktivieren.

Not Ready Timeout (nur für LC und CE)

Der Parameter “Not Ready Timeout” im Dialogfeld “Sequence Parameters” bestimmt die Zeitdauer, die das System maximal darauf wartet, daß ein Analysengerät bereit ist. Nach einer Zeitüberschreitung erfolgt eine Abschaltung (Shutdown).

Wait Time (nur für LC und CE)

Im Dialogfeld “Sequence Parameters” kann eine Wartezeit spezifiziert werden, die nach Laden der Methode und vor der ersten Injektion mit dieser Methode verstreicht. Dies könnte der Equilibrierung von Säule oder Kapillare unter neuen analytischen Bedingungen dienen.

Automatische Rekalibrierung

Eine Kalibrierung wird meistens nach einer Änderung der Arbeitsbedingungen, zum Beispiel nach dem Wechsel einer Säule oder Kapillare, durchgeführt. Eine automatische Rekalibrierung wird normalerweise beim Start einer Analysensequenz oder in regelmäßigen Abständen während der Sequenz zur Kompensation von Faktoren durchgeführt, die das analytische Ergebnis beeinflussen.

Zwei Möglichkeiten stehen zur Durchführung einer automatischen Sequenzrekalibrierung zur Verfügung:

- Explizit angegebene Kalibriersequenzen
- Zyklische Kalibriersequenzen

Spezifizieren von Rekalibrierungen

Die Parameter zur Rekalibrierung einer Sequenz werden direkt in die Sequenztabelle eingetragen. Diese Parameter legen fest, wie die Methode im Lauf einer Sequenz rekalibriert wird.

Die Rekalibrierparameter in der Sequenztabelle

Der Responsefaktor und die Retentions- bzw. Migrationszeiten können auf mehrere Arten aktualisiert werden. Der Kalibrierpunkt, der aktualisierte Responsefaktor und aktualisierte Retentions- bzw. Migrationszeiten werden in der Datenauswertung benutzt, wenn die Kalibriertabelle rekalibriert wurde.

Wenn in der Spalte mit der Beschriftung “ SampleType” der Probentabelle “Calibration “ eingegeben ist, werden folgende Spalten aktiviert und somit editierbar:

- CAL level
- Update RT
- Update RF
- Intervall

Die Werte, die man für jede dieser Spalten eingeben kann, sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10 zeigt die Spalten der Sequenztabelle, die die Rekalibrierparameter enthalten sowie die verwendbaren Werte.

Keine Aktualisierung (No Update)

Responsfaktoren oder Retentions- bzw. Migrationszeiten werden nicht aktualisiert.

Ersetzen (Replace)

Ersetzt die vorigen Responsefaktoren (Flächen oder Höhen) mit den Werten des aktuellen Laufes. Der Response wird für Peaks, die in diesem Lauf nicht gefunden wurden, nicht geändert.

Tabelle 10 **Rekalibrierparameter in der Sequenztabelle**

CAL level	Update RT	Update RF	Intervall
Kalibriertabelle Stufe (Level) # (1-999)	No update (Kein Update)	No update (Kein Update)	Zyklisches Rekalibrierintervall # (1-999)
	Mittelwert (Average)	Mittelwert (Average)	Blank
	Ersetzen (Replace)	Ersetzen (Replace)	
		Bracket (Umschließen)	
		Delta%	

Mittelwert (Average)

Aus den Responsefaktoren (Flächen oder Höhen) der Originalkalibrierung und allen nachfolgenden Kalibrierungen werden Mittelwerte gebildet. Wenn ein Peak in einem der Rekalibrierläufe fehlt, wird der durchschnittliche Response nicht beeinträchtigt.

Umschließen (Bracket)

Die Analysenläufe werden von Kalibrierungen vor und nach der Messung umschlossen. Die Auswertung wird durchgeführt, nachdem die letzte Kalibrierprobe vermessen wurde. Die zuvor durchgeführten Kalibrierdaten werden durch die neuen Ergebnisse ersetzt, die nachfolgenden Kalibrierungen werden zur Mittelwertbildung mit dieser Kalibriertabelle verwendet.

Intervall

Das Intervall legt die Häufigkeit von Rekalibrierungen während der Durchführung einer Sequenz fest. Die Kalibrierhäufigkeit nennt die Anzahl durchzuführender Analysenläufe, bevor Kalibrierproben injiziert werden. Zu Beginn des Analysenlaufes wird eine Kalibriertabelle mit den Ergebnissen (Responsefaktoren) erstellt. Diese Ergebnisse werden in den nachfolgenden quantitativen Berechnungen verwendet. Nach der vorgegebenen Zahl von Injektionen wird eine erneute Kalibrierung durchgeführt. Deren Ergebnisse werden in die Kalibriertabelle eingegeben und überschreiben die früheren Ergebnisse.

Delta%

Mit Hilfe der Delta%-Berechnung lassen sich die Responsefaktoren einer Analyse mit Responsefaktoren vergleichen, die von Hand in eine Kalibriertabelle eingetragen wurden. Dabei wird Delta% auf alle kalibrierten Peaks der Tabelle angewendet. Sie können verschiedene interne Standards bestimmen, über deren gemessene Responsefaktoren dann die neuen Responsefaktoren der anderen Peaks berechnet werden. Sie legen für jeden Peak in der Kalibriertabelle fest, welcher interne Standard für die Delta%-Berechnung verwendet werden soll.

Sequenztypen

Es gibt folgende Sequenztypen:

- Explizite Kalibriersequenzen
- Explizite Kalibriersequenzen eines Kalibrierpunkts
- Zyklische Kalibriersequenzen mehrerer Kalibrierpunkte
- Explizite und zyklische Kalibrierungen in einer Sequenz
- Umschließende zyklische Kalibriersequenzen

Explizite Kalibriersequenzen

Dieser Sequenztyp führt eine Rekalibrierung in Intervallen durch, die Sie in der Sequenztabelle eingeben können.

Zur Durchführung expliziter Kalibriersequenzen werden die Kalibrierproben in die Sequenz eingegeben, ohne daß ein Eintrag für ein Intervall in der Sequenztabelle erfolgt. Eine Rekalibrierung wird mit jeder in der Sequenztabelle eingetragenen Kalibrierprobe durchgeführt.

Zyklische Kalibriersequenzen eines Kalibrierpunkts

Dieser Sequenztyp entnimmt in regelmäßigen Abständen Kalibrierlösung aus demselben Probenfläschchen.

Das Intervall in der Sequenztabelle legt fest, wie oft die Rekalibrierung durchgeführt wird. Ein Intervall von 2 führt zu einer Rekalibrierung nach jeweils zwei vermessenen Proben der Sequenz.

Zyklische Kalibriersequenzen mit mehrerer Kalibrierpunkte

Dieser Sequenztyp benutzt mehrereKalibrierproben zur Rekalibrierung einer Mehrpunktkalibriermethode.

Das folgende Beispiel beschreibt eine Sequenz, die aus den beiden Methoden A und B zur Kalibrierung zweier verschiedener Probengruppen besteht. Beide Methoden sind Mehrpunktkalibrierungen die in definierten Intervallen automatisch rekalibriert werden.

< 1>Für jede Methode existieren drei Einträge in der Sequenztabelle:

- Zwei Kalibrierpunkte:

  Sequenzzeilen 1 und 2 in Methode A.

  Sequenzzeilen 8 und 9 in Methode B.

- Fünf Einträge für Proben:

  Sequenzzeilen 3 bis 7 für Methode A.

  Sequenzzeilen 10 bis 14 für Methode B.

Die Angabe der regelmäßigen Intervalle erfolgt durch Einträge unter “Recalibration Interval” in der Rekalibriertabelle der Sequenz.

- Methode A wird nach der Vermessung von jeweils 2 Proben rekalibriert.
- Methode B wird nach der Vermessung von jeweils 3 Proben rekalibriert.

Die unten aufgeführte Sequenztabelle ist zur Vereinfachung des Beispiels verkürzt.

Tabelle 11 **Sequenztabelle für Methode A und Methode B**

Zei-le	Vial	Proben-name	Methoden-name	Inj/Vial	Pobenart	CAL level	Update RF	Update RT	Intervall	…
1	1		Methode A	1	Kalibrierung	1	Mittelwert (Average)	No update (Kein Update)	2	…
2	2		Methode A	1	Kalibrierung	2	Mittelwert (Average)	No update (Kein Update)	2	…

Tabelle 11 **Sequenztabelle für Methode A und Methode B, continued**

Zei-le	Vial	Proben-name	Methoden-name	Inj/Vial	Pobenart	CAL level	Update RF	Update RT	Intervall	…
3	10		Methode A	1						…
4	11		Methode A	1						…
5	12		Methode A	1						…
6	13		Methode A	1						…
7	14		Methode A	1						…
8	3		Methode B	1	Kalibrierung	1	Mittelwert (Average)	No update (Kein Update)	3	…
9	5		Methode B	2	Kalibrierung	2	Mittelwert (Average)	No update (Kein Update)	3	…
10	20		Methode B	1						…
11	21		Methode B	1						…
12	22		Methode B	1						…
13	23		Methode B	1						…
14	24		Methode B	1						…

Analysenfolge der Methode A

Dieser Abschnitt beschreibt die Analysenfolge der Methode A, die den ersten Teil der Sequenz mit zwei Methoden darstellt.

Analysenfolge der Methode B

Dieser Abschnitt beschreibt die Analysenfolge der Methode B, die den zweiten Teil der Sequenz mit zwei Methoden darstellt.

Methode B unterscheidet sich in folgenden Punkten von Methode A:

- Der Level 2 wird mit 2 Injektionen pro Probenfläschchen gewonnen. Das Intervall wird auf 3 gestellt.

Tabelle 12 **Analysenfolge der Methode A**

Inj Nr.	Methode	Vial	Operation
1	Methode A	1	Level 1 und Report
2	Methode A	2	Level 2 und Report
3	Methode A	10	Analysenlauf und Report
4	Methode A	11	Analysenlauf und Report
5	Methode A	1	Level 1 und Report
6	Methode A	2	Level 2 und Report
7	Methode A	12	Analysenlauf und Report
8	Methode A	13	Analysenlauf und Report
9	Methode A	1	Level 1 und Report
10	Methode A	2	Level 2 und Report
11	Methode A	14	Analysenlauf und Report

Bitte beachten Sie, daß die Ergebnisse in Tabelle 12 und Tabelle 13 durch Verwendung von “Partial Sequence” dargestellt werden können. Nachdem die Sequenztabelle erstellt wurde, kann damit eine Vorschau auf die Ablauffolge aufgerufen werden.

Tabelle 13 **Analysenfolge der Methode B**

Inj Nr.	Methode	Vial	Operation
12	Methode B	3	Level 1 und Report
13	Methode B	5	Level 2 und Report
14	Methode B	5	Level 2 und Report
15	Methode B	20	Analysenlauf und Report
16	Methode B	21	Analysenlauf und Report
17	Methode B	22	Analysenlauf und Report
18	Methode B	3	Level 1 und Report
19	Methode B	5	Level 2 und Report
20	Methode B	5	Level 2 und Report
21	Methode B	23	Analysenlauf und Report
22	Methode B	24	Analysenlauf und Report

Kombination aus expliziter und zyklischer Kalibrierung

Dieser Sequenztyp besteht aus expliziten und zyklischen Kalibrierungen in derselben Sequenz.

Diese Möglichkeit erlaubt Ihnen eine komplette Rekalibrierung der Methode zu Beginn einer Sequenz (*explizite Rekalibrierung*) und danach die Aktualisierung der Kalibrierung (*zyklische Rekalibrierung*) während der Sequenz.

- *Es müssen für jeden Kalibrierpunkt (Level) in der Tabelle "Sequence Recalibration" zwei Zeilen für die Kalibrierung angegeben werden. Eine Zeile enthält die Einträge für die explizite, die andere für die zyklische Rekalibrierung.*
- Die Sequenztabelle *muß* Einträge für jede Kalibrierzeile aufweisen. Alle Probenfläschchen der zyklischen Rekalibrierungen *müssen* vor den Einträgen der expliziten Rekalibrierung und der Proben selbst eingetragen werden.

Beispiel

Die unten dargestellte Sequenztabelle zeigt eine Methode mit Einpunktkalibrierung namens SimpReg. Sie ist zur Vereinfachung des Beispiels verkürzt.

Tabelle 14 **Sequenztabelle für SIMPREG**

1	1		SimpReg	1	Kalibrierung	1	Mittelwert (Average)	Mittelwert (Average)	3	…
2	1		SimpReg	1	Kalibrierung	1	Ersetzen (Replace)	Ersetzen (Replace)		…
3	2		SimpReg	1						…
4	3		SimpReg	1						…
5	4		SimpReg	1						…
6	5		SimpReg	1						…

Tabelle 14 **Sequenztabelle für SIMPREG**

7	6		SimpReg	1						…
										…

Die Tabelle hat zwei Einträge für einen Kalibrierpunkt.

- Die erste Zeile bezieht sich auf denselben Kalibrierpunkt und gibt die Mittelwertbildung der Rekalibrierparameter vor. Das Rekalibrierintervall gibt an, daß nach je drei Proben eine Rekalibrierung durchgeführt wird.
- Mit dem zweiten Eintrag werden alle Kalibrierparameter ersetzt; das bedeuted, daß eine komplette Rekalibrierung *ohne* Rekalibrierintervall durchgeführt wird.

Sequenztabelle

Die Sequenztabelle besteht aus sieben Zeilen. Die erste Zeile spezifiziert die Probe zur zyklischen Rekalibrierung. Die zweite Zeile spezifiziert die explizite Rekalibrierung, die zu Beginn der Sequenz durchgeführt wird. Die dritte bis siebte Zeile spezifiziert die zu analysierenden Proben.

Die Reihenfolge der Einträge in die Sequenztabelle ist sehr wichtig. Alle Einträge zu Probenfläschchen für zyklische Rekalibrierungen *müssen vor* den Einträgen der Proben oder den Einträgen zur expliziten Rekalibrierung der Methode stehen.

Analysenfolge der Methode SimpReg

In diesem Abschnitt wird die Analysenfolge der Methode SimpReg beschrieben.

Tabelle 15 **Analysenfolge der Methode SimpReg**

Seq. Zeile	Inj Nr.	Methode	Vial	Operation
2	1	SimpReg	1	einfache Kalibrierung
1	2	SimpReg	1	regelmäßige Kalibrierung
3	3	SimpReg	2	Analysenlauf
3	4	SimpReg	3	Analysenlauf
4	5	SimpReg	4	Analysenlauf
5	6	SimpReg	1	regelmäßige Kalibrierung
6	7	SimpReg	5	Analysenlauf
7	8	SimpReg	6	Analysenlauf

Umschließende zyklische Kalibriersequenzen (Bracketing)

Dieser Sequenztyp interpoliert Kalibrierungen über eine oder mehrere unbekannte Proben. Dies dient einer exakteren Berücksichtigung des Response des Analysengerätes zum Analysenzeitpunkt. Durch die Verwendung einer umschließenden Kalibrierung können die Auswirkungen einer instrumentellen Drift minimiert werden.

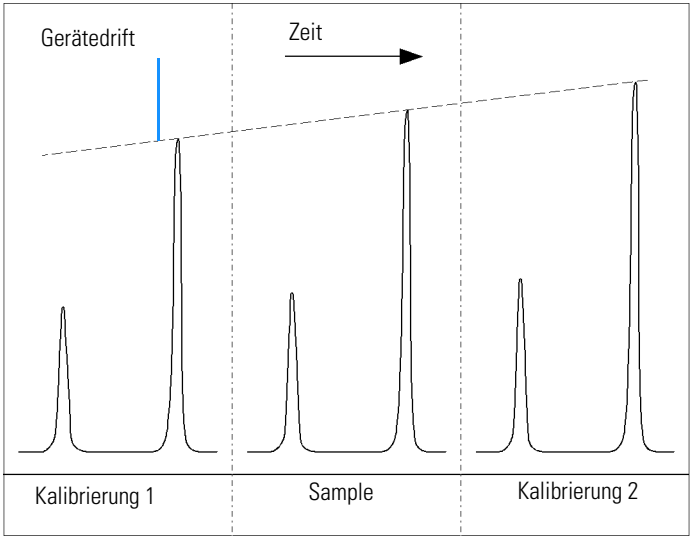
Beispiel

Folgende Situation soll betrachtet werden:

- Das Analysengerät zeigt einen Response mit Drift.
- Es werden drei Injektionen identischer Mischungen mit drei Substanzen durchgeführt.
- Zwei dieser Injektionen werden als Kalibrierproben, eine weitere als Probe spezifiziert.
- Die erste und dritte Probe sind die Kalibrierproben.
- Die zweite Injektion ist eine Probe gemäß Abbildung 41.

Zur Berechnung eines möglichst exakten Ergebnisses für die zweite Injektion (der Probe) muß zwischen den beiden Kalibrierungen eine Interpolation durchgeführt werden, wie in Abbildung 41 gezeigt. Dieser Prozeß heißt umschließende Kalibrierung (Bracketing).

Abbildung 41 **Umschließende Kalibrierung**



Die Kalibriertabelle zur quantitativen Auswertung der Probe wird bei einer zyklisch kalibrierten Sequenz durch Mittelwertbildung aus den Ergebnissen der aktuellen und der vorherigen Kalibrierung gewonnen. Diese neue Kalibriertabelle stellt eine exaktere Berücksichtigung des Response des Analysengerätes zum Zeitpunkt der Probenvermessung dar.

Arbeitsschritte einer umschließenden Kalibrierung

- Die ersten Probenfläschchen der Kalibrierung werden analysiert.
- Die Proben werden analysiert.
- Die nächsten Kalibrierproben werden analysiert.
- In der Kalibriertabelle werden die Responsefaktoren durch Mittelwertbildung aus den Ergebnissen der umschließenden Kalibrierung berechnet.
- Die Datensätze der Proben werden ausgewertet und die Reports werden erstellt.
- Die Sequenz wiederholt Schritt 2, falls weitere Proben analysiert werden müssen.

Beispiel

In diesem Abschnitt wird eine umschließende Kalibrierung beschrieben, die aus einer Methode mit dem Namen Brack.M besteht. Die Methode Brack.M ist eine Methode mit zwei Kalibrierpunkten und internem Standard mit zyklischer Kalibrierung.

Sequenztabelle

Die Sequenztabelle für die Methode Brack.M (nächste Seite) ist zur Vereinfachung des Beispiels verkürzt. Sie besteht aus sieben Zeilen, wovon die ersten beiden Zeilen die Rekalibrierbedingungen für jede Stufe festlegen. In den verbleibenden Zeilen werden die zu analysierenden Proben definiert.

Die Sequenztabelle für die Methode Brack.M besteht aus:

- Dem Eintrag “Bracket” in der Spalte “Update Response Factor”, wodurch die Umschließung der Proben mit Kalibrierungen spezifiziert wird.
- Dem Eintrag “Replace” in der Spalte “Update Retention/Migration Times”, wodurch Retentions- bzw. Migrationszeiten ersetzt werden.
- Dem Eintrag “3” in der Spalte “Recalib Interval”, wodurch eine Rekalibrierung nach jeweils drei Proben spezifiziert wird.

Tabelle 16 **Sequenztabelle der Methode BRACK-M**

1	1		BRACK-M	2	Kalibrierung	1	Bracket (Umschließen)	Ersetzen (Replace)	3	…
2	2		BRACK-M	2	Kalibrierung	2	Bracket (Umschließen)	Ersetzen (Replace)	3	…
3	10		BRACK-M	1						…
4	11		BRACK-M	1						…
5	12		BRACK-M	1						…
6	13		BRACK-M	1						…
7	14		BRACK-M	1						…

Analysenfolge der Sequenz mit umschließender Kalibrierung

Run No.	Method Name	Vial No.	Inj No.	DataFile Name	Lvl No.	Upd RF	Upd Ret	Operation
1	Brack.M	1	1	c1-03001.d	1	R	R	Report for Calibration Run No.1
2	Brack.M	1	2	c1-03002.d	1	A	R	Report for Calibration Run No.2
3	Brack.M	2	1	c2-03001.d	2	R	R	Report for Calibration Run No.3
4	Brack.M	2	2	c2-03002.d	2	A	R	Report for Calibration Run No.4
								Print Calibration Table
5	Brack.M	10	1	010-0301.d				Sample Analysis, no report
6	Brack.M	11	1	011-0301.d				Sample Analysis, no report
7	Brack.M	12	1	012-0301.d				Sample Analysis, no report
8	Brack.M	1	1	c1-03003.d	1	A	R	Calibration Analysis, no report
9	Brack.M	1	2	c1-03004.d	1	A	R	Calibration Analysis, no report
10	Brack.M	2	1	c2-03003.d	2	A	R	Calibration Analysis, no report
11	Brack.M	2	2	c2-03004.d	2	A	R	Calibration Analysis, no report
								Print Calibration Table
				010-0301.d				Report for Sample Run No.5
				011-0301.d				Report for Sample Run No.6
				012-0301.d				Report for Sample Run No.7
				c1-03003.d	1	R		Report for Calibration Run No.8
				c1-03004.d	1	A		Report for Calibration Run No.9
				c2-03003.d	2	R		Report for Calibration Run No.10
				c2-03004.d	2	A		Report for Calibration Run No.11
12	Brack.M	13	1	013-0301.d				Sample Analysis, no report
13	Brack.M	14	1	014-0301.d				Sample Analysis, no report
14	Brack.M	1	1	c1-03005.d	1	A	R	Calibration Analysis, no report
15	Brack.M	1	2	c1-03006.d	1	A	R	Calibration Analysis, no report
16	Brack.M	2	1	c2-03005.d	2	A	R	Calibration Analysis, no report
17	Brack.M	2	2	c2-03006.d	2	A	R	Calibration Analysis, no report
								Print Calibration Table
				013-0301.d				Report for Sample Run No.12
				014-0301.d				Report for Sample Run No.13
				c1-03005.d	1	R		Report for Calibration Run No.14
				c1-03006.d	1	A		Report for Calibration Run No.15
				c2-03005.d	2	R		Report for Calibration Run No.16
				c2-03006.d	2	A		Report for Calibration Run No.17

Where A = Mittelwert (Average)
R = Ersetzten (Replace)

Zyklische Rekalibriersequenzen mit mehreren Probenfläschchen, die dieselbe Standardverdünnung enthalten

Zyklische Rekalibriersequenz unter zyklischer Verwendung von mehreren Kalibrierfläschchen

Wenn man eine lange Sequenz mit zyklischer Rekalibrierung laufen läßt, das heißt eine automatische Rekalibrierung nach einer festen Anzahl von Probeninjektionen durchführt, besteht die Gefahr, daß das Kalibrierfläschchen im Lauf der Sequenz geleert wird. Die Sequenztabelle der ChemStation bietet die Möglichkeit, eine Reihe von Probengefäßen mit derselben Standardverdünnung *zyklisch nacheinander* zu verwenden.

Über diese Möglichkeit lassen sich lange Sequenzen mit automatischen Rekalibrierläufen nach festen Intervallen definieren, bei denen die Kalibriersubstanzen für jede Stufe aus mehreren Probenfläschchen pipettiert und gleichmäßig verbraucht werden.

Wenn man die passende Anzahl von Kalibrierfläschchen einsetzt, wird jedes Kalibrierfläschchen nur einmal verwendet. Dies ist besonders bei solchen Fällen erforderlich, bei denen für jede Rekalibrierung ein neues Kalibrierfläschchen verwendet werden muß, weil Lösungsmittel oder oder reagieren können. Der folgende Abschnitt beschreibt, wie die Sequenztabelle der ChemStation ausgefüllt werden muß, um diese Anforderungen zu erfüllen.

Bestimmen Sie über die Anzahl der Kalibrierungen innerhalb einer Sequenz die Menge an Kalibrierfläschchen für jede Stufe.

Legen Sie für jedes Kalibrierfläschchen eine gesonderte Zeile für die zyklische Rekalibrierung an. Informationen für dieselbe Kalibrierstufe müssen in angrenzenden Zeilen der Sequenztabelle stehen und auch die festgelegten Positionen der Kalibrierfläschchen müssen nebeneinander liegen. Wählen Sie für alle Kalibrierzeilen identische Intervalle für die Rekalibrierung. Wenn Ihre Sequenz beispielsweise alle 6 Probeninjektionen eine Kalibrierung durchführen soll, müssen Sie das Rekalibrierintervall auf 6 stellen.

Die Proben werden in folgender Reihenfolge abgearbeitet:

- Probenfläschchen 1 (Cal1a)

Tabelle 17 **Zyklische Rekalibriersequenz mit drei Fläschchen für jede Kalibrierstufe**

Vial No.	Sample Name	Sample Type	Method Name	No. of Inj.	Lvl	Upd RT	Upd RF	Intervall
1	Cal1a	Calib	Methode A	1	1	Avg	Avg	6
2	Cal1b	Calib	Methode A	1	1	Avg	Avg	6
3	Cal1c	Calib	Methode A	1	1	Avg	Avg	6
5	Cal2a	Calib	Methode A	1	2	Avg	Avg	6
6	Cal2b	Calib	Methode A	1	2	Avg	Avg	6
7	Cal2c	Calib	Methode A	1	2	Avg	Avg	6
10	Sample10	Sample	Methode A	6				
11	Sample11	Sample	Methode A	6				
12	Sample12	Sample	Methode A	6				
13	Sample13	Sample	Methode A	6				
14	Sample14	Sample	Methode A	6				

- Probenfläschchen 5 (Cal2a)
- 6 Injektionen aus Probenfläschchen 10 (Probe 10)
- Probenfläschchen 2 (Cal1b)
- Probenfläschchen 6 (Cal2b)
- 6 Injektionen aus Probenfläschchen 11 (Probe 11)
- Probenfläschchen 3 (Cal1c)
- Probenfläschchen 7 (Cal2c)
- 6 Injektionen aus Probenfläschchen 12 (Probe 12)
- Probenfläschchen 1 (Cal1a)
- Probenfläschchen 5 (Cal2a)
- 6 Injektionen aus Probenfläschchen 13 (Probe 13)
- Probenfläschchen 2 (Cal1b)
- Probenfläschchen 6 (Cal2b)
- usw.

Zyklische Rekalibrierung aus verschiedenen Kalibrierfläschchen

Um sicherzustellen, daß aus jedem Kalibrierfläschchen nur einmal injiziert wird, muß die Sequenz eine ausreichende Anzahl von verschiedenen Kalibrierfläschchen festlegen, so daß die *zyklische* Abfolge, die im folgenden Beispiel beschrieben wird, nicht vorliegt. Wenn in einer Sequenz zum Beispiel 80 Proben analysiert und nach jeweils 10 Proben Rekalibrierungen erfolgen sollen, muß die Sequenztabelle für jede Stufe 80/10 + 1= 9 Kalibrierzeilen enthalten.

Wie im letzten Beispiel müssen die Zeilen, die aneinandergrenzende Positionen kennzeichnen auch in der Sequenztabelle benachbart sein.

Umschließende Sequenz mit verschiedenen Kalibierfläschchen vor und nach den Probeninjektionen

Diese Möglichkeit läßt sich auch bei umschließenden Sequenzen anwenden. Eine umschließende Sequenz kann so definiert werden, daß für den Kalibrierlauf vor den Proben ein anderes Fläschchen benutzt wird, als für den nach den Proben, indem die entsprechende Anzahl von Kalibrierfläschchen eingesetzt wird. Auch in diesem Fall müssen die Kalibrierzeilen innerhalb der Sequenz wie auch die Positionen der Kalibrierfläschchen aneinandergrenzen.

Ob die Kalibrierfläschchen für die umschließende Sequenz zyklisch nacheinander oder nur einmal injiziert werden, hängt einzig von der Anzahl der Kalibrierfläschchen für jede Stufe ab und davon, wie häufig innerhalb der Sequenz rekalibriert werden soll.

Im folgenden Beispiel sind 3 Injektionen mit umschließender Kalibrierung definiert. Die Kalibriersubstanz für den anfänglichen Kalibrierlauf wird aus einem anderen Fläschchen entnommen, als die für den abschließenden Kalibrierlauf. Nach jeder Probeninjektion soll rekalibriert werden; folglich

muß das Rekalibrierintervall 1 betragen. Die Anzahl an Kalibierzeilen pro Stufe entspricht der Anzahl der Proben plus eins.

Tabelle 18 **Verschiedene Fläschchen für die Kalibrierläufe vor und nach den Probeninjektionen**

Vial No.	Sample Name	Sample Type	Method Name	No. of Inj.	Lvl	Upd RT	Upd RF	Intervall
1	Cal1a	Calib	Methode A	1	1	Brkt	Brkt	1
2	Cal1b	Calib	Methode A	1	1	Brkt	Brkt	1
3	Cal1c	Calib	Methode A	1	1	Brkt	Brkt	1
4	Cal1d	Calib	Methode A	1	1	Brkt	Brkt	1
10	Sample10	Sample	Methode A	1				
11	Sample11	Sample	Methode A	1				
12	Sample12	Sample	Methode A	1				

Die Sequenz wird in folgender Reihenfolge durchgeführt:

- Probenfläschchen 1 (Cal1a), Kalibrierlauf vor dem 1. Probensatz
- Probenfläschchen 10 (Probe 10)
- Probenfläschchen 2 (Cal1b), Kalibrierlauf nach dem 1. und vor dem 2. Probensatz
- Probenfläschchen 11 (Probe 11)
- Probenfläschchen 3 (Cal1c), Kalibrierlauf nach dem 2. und vor dem 3. Probensatz
- Probenfläschchen 12 (Probe 12)
- Probenfläschchen 4 (Cal1d), Kalibrierlauf nach dem 3. Probensatz

Zyklische Rekalibriersequenzen mit mehreren Probenfläschchen, die dieselbe Standardverdünnung enthalten

11

Batch-Review

Batch-Review

In diesem Kapitel werden folgende Themen behandelt:

- Was versteht man unter Batch-Review?
- Batch-Konfiguration
- Funktionen für den Review
- Batch-Reports

Was versteht man unter Batch-Review?

Unter "Batch-Review" versteht man die Möglichkeit, schnell einen ersten Überblick über die Ergebnisse einer Sequenz oder einer Auswahl von Analysenläufen zu erhalten. Dies ist vor allem bei großen Probenzahlen sehr zeitsparend. Immer wenn eine Sequenz ausgeführt wird, wird automatisch eine Batch-Datei (mit der Dateinamenwerweiterung .b) erstellt und mit den Datensätzen im Datenverzeichnis abgelegt. Diese Batch-Datei enthält Zeiger auf die entsprechenden Datensätze des Batch-Reviews. Um einen Batch zu laden, muß der Anwender nur eine Methode für den Batch anwählen und dann die einzelnen Datensätze aussuchen, die innerhalb des Batches bearbeitet werden sollen. Man kann die Genauigkeit der Kalibrierung, die Leistungsfähigkeit des Systems und die einzelnen Integrationen überprüfen, ehe man die Ergebnisse verbessert. Alle Integrationsparameter, die für ein Chromatogramm spezifisch sind, sowie ihre Änderungen werden aus Gründen der Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse mit dem Datensatz gespeichert. Diese interaktive Umgebung bietet auch den vollen Zugriff auf alle anderen Funktionen der Datenauswertung, wie die Überprüfung der Peakreinheit, die Bibliothekssuche usw.

Der Batch-Review verwendet dieselben Register für die Datenauswertung (ChromReg and ChromRes) wie die Standard-Datenauswertung und sollte daher nicht innerhalb einer Online-Sitzung zum Einsatz kommen, in der gerade Analysen duchgeführt werden.

Batch-Konfiguration

Als Batch bezeichnet man eine individuelle Auswahl von Datensätzen, die mit einer indviduell bestimmten Methode ausgewertet werden. Dabei wird für alle Datensätze innerhalb eines Batches dieselbe Methode verwendet. Die Auswertungsschritte, die für jede zu bearbeitende Probe im Review durchgeführt werden sollen, sind frei wählbar (Integration, Identifizierung/Quantifizierung, Reporterstellung).

Die Ergebnissse aller Kalibrierläufe eines Batches gehen über gemittelte Response-Faktoren in eine Kalibriertabelle ein, die dann zur Quantifizierung verwendet wird.

Batch-Tabelle

Die Läufe werden in einer frei definierbaren Batch-Tabelle angezeigt:

- die Anzahl und der Inhalt der Tabellenspalten kann festgelegt werden;
- die Läufe können folgendermaßen sortiert werden

  nach dem Laufindex (in der Reihenfolge, in der sie aufgenommen wurden) unabhängig von allen anderen Kriterien,

  nach der Probenart (erst die Kontrollen, dann die Standards, dann die Proben) und innerhalb einer Probenart nach dem Laufindex,

  nach der Methode (wenn mehr als eine Methode zur Datenaufnahme verwendet wurde) und innerhalb jeder Methode nach dem Laufindex;
- Proben, Standards und Kontrollen können in der Tabelle angezeigt oder versteckt werden.

Jeder Lauf macht eine Zeile der Batch-Tabelle aus. Sie können einzelne Läufe aus der Batch-Tabelle ausblenden, indem Sie sie auf die Probenart "Removed" (entfernt) setzen.

Substanztabelle

Die Ergebnisse für die Substanzen werden in einer individuell definierbaren Substanztabelle dargestellt, deren Inhalt von den Probenarten der Batch-Tabelle abhängt:

- Die Substanzliste enthält alle Substanzen, die in der Methode aufgeführt

wurden, die im Batch-Review zum Einsatz kam;

- wenn nur Standards in der Batch-Tabelle aufgeführt sind (Proben und Kontrollen also versteckt sind), enthält die Substanztabelle zusätzliche Spalten für weitere Informationen zum Standard (erwartete Menge, relativer und absoluter Fehler);
- wenn nur Kontrollen in der Batch-Tabelle aufgeführt sind (Proben und Standards also versteckt sind), enthält die Substanztabelle zusätzliche Spalten für mögliche Grenzwerte.

Für Spalten, die Substanz-spezifische Informationen enthalten, können Sie den Namen der Substanz in den Titel der Tabelle aufnehmen, indem Sie in die Spaltenbedingungen **%s** aufnehmen.

Batch-Report

Der Batch-Report enthält zwei Tabellen, die im Allgemeinen der Batch- und der Substanztabelle entsprechen; auch diese Tabellen sind individuell definierbar.

Für Spalten, die Substanz-spezifische Informationen enthalten, können Sie den Namen der Substanz in den Titel der Tabelle aufnehmen, indem Sie in die Spaltenbedingungen **%s** aufnehmen. Auch mehrzeilige Kopfzeilen sind erlaubt; über Eingabe des Zeichens ‘|’ erfolgt ein Zeilenumbruch an dieser Stelle.

Benutzeroberfläche

Der Batch-Review ermöglicht die Auswahl zwischen zwei Benutzeroberflächen:

- die Standardoberfläche enthält eine Leiste mit Schaltflächen, die den Zugriff auf die meisten Menüeinträge für den Batch ermöglichen, einschließlich der Batch- und Substanztabelle;
- eine minimale Benutzeroberfläche bietet eine ganz ähnliche Symbolleiste, wobei allerdings die Batch- und die Substanztabelle durch ein Feld ersetzt sind, das nur die Information für die festgelegte Batch-Tabelle enthält. Die Symbolleiste für die minimale Benutzeroberfläche enthält keine direkte Schaltflächen für die Batch- oder die Substanztabelle.

Funktionen für den Review

Datendateien können auf zwei unterschiedliche Arten dargestellt werden:

- manuell, indem aus der Tabelle ein darzustellender Lauf ausgewählt wird,
- automatisch, mit festgelegten Intervallen zwischen den einzelnen Datensätzen. Bei der automatischen Darstellung werden nur die Probenarten dargestellt, die auch in der Tabelle zu sehen sind; die Läufe werden entsprechend der Reihenfolge, in der sie in der Tabelle aufgeführt sind, dargestellt. Der automatische Überblick kann angehalten und später weitergeführt oder ganz gestoppt werden.

Die Standardfunktionen der ChemStation sind auch im Batch-Review verfügbar. Sie beinhalten die Kalibrierung, die manuelle Änderung von Chromatogrammen, wie z.B. die Glättung oder die manuelle Integration. Alle Änderungen, die an einer Datendatei vorgenommen werden, lassen sich kennzeichnen und mit dem Datensatz abspeichern. Chromatogramme, die nachbearbeitet wurden, werden in der Batch-Tabelle mit einem Sternchen markiert. Sie können auch die Änderungen des aktuellen Chromatogrammes oder die Änderungen aller Chromatogramme des Batches wieder verwerfen.

Wenn ein Lauf aufgerufen wird, werden die ausgewählten Bearbeitungsschritte durchgeführt; wenn der Lauf bereits bearbeitet und mit den Änderungen abgespeichert wurde, wird er in seiner nachbearbeiteten Form aufgerufen. Dies geht natürlich schneller, da die Bearbeitungsschritte nicht mehr durchgeführt werden müssen.

Batch-Reports

Die individuell definierbare “Batch-Tabelle”, siehe Seite238, kann direkt auf dem Drucker, auf dem Bildschirm oder in eine Datei ausgegeben werden. Die Datei besteht aus einem wählbarem Prefix und kann in einem der folgenden Formate abgelegt werden:

- als ASCII-Textdatei mit der Dateinamenerweiterung .TXT
- im Data Interchange Format mit der Dateinamenerweiterung .DIF
- im CSV-Format (Comma-Separated Values) mit der Dateinamenerweiterung .CSV
- im Microsoft Excel-Format mit der Dateinamenerweiterung .XLS.

Die Optionen für die Reporterstellung ermöglichen es auch, die Proben unabhängig von der Reihenfolge in der Batch-Tabelle zu sortieren (über den Laufindex, die Probenart oder die Methode). Die Prioritäten für die Reihenfolge entsprechen denen für die “Batch-Tabelle”, siehe Seite238.

Batch-History

Der Batch-Review zeichnet alle Aktionen innerhalb des aktuellen Batches auf. Aktionen, die zu Änderungen des Batches führen (zum Beispiel eine Änderung des dargestellten Chromatogrammes, eine Änderung der Probenart, Laden und Speichern des Batches) erweitert die Batch-History um eine Zeile mit Datum- und Zeitangabe, dem Namen des derzeitigen Anwenders sowie einer Beschreibung des Vorganges.

Sie können der Batch-History auch eigene Kommentare hinzufügen. Vorhandene Einträge in der Batch-History lassen sich nicht ändern. Die Auflistung kann nur über die Menüeinträge für "Batch History" aufgerufen werden.

12

Verwendung der ChemStation Reports

Verwendung der ChemStation Reports

In diesem Kapitel werden folgende Themen behandelt:

- Was ist ein Report?
- Reportergebnisse
- Quantitative Ergebnisse
- Reportvorlagen
- Reportausgabe
- Zusammenfassende Reports einer Sequenz

Was ist ein Report?

Ein Report kann aus qualitativen und quantitativen Informationen zu einer analysierten Probe bestehen. Der Report kann als Ausdruck, als Bildschirmdarstellung oder als elektronische Datei ausgegeben werden. Der Report kann Details der Peakerkennung eines Analysenlaufes enthalten und Darstellungen der Chromatogramme bzw. Elektropherogramme.

Reportergebnisse

Es stehen zwei Reporttypen zur Verfügung:

- Ein unkalibrierter Report ohne Korrektur des Detektor-Response
- Ein kalibrierter Report mit korrigiertem Detektor-Response für unterschiedliche Substanzen.

Unkalibrierte Reports

Unkalibrierte Reports umfassen die Reports Flächen% und Höhen%. Diese Reports werden hauptsächlich zur Vorbereitung kalibrierter Reports verwendet. Sie können auch als endgültiger Report benutzt werden, wenn die Substanzen vergleichbare Responsefaktoren aufweisen, so daß sich auch ähnliche Flächen- oder Höhenwerte ergeben.

Kalibrierte Reports

In kalibrierten Reports werden die unterschiedlichen Responsefaktoren der untersuchten Substanzen berücksichtigt. Eine oder mehrere Kalibrierproben mit bekanntem Gehalt dieser Substanzen müssen dazu unter identischen Bedingungen vermessen werden. Die integrierten Daten dieser Kalibrierprobe(n) werden zur Erstellung einer Kalibriertabelle benötigt. Das ist eine Liste von Retentions- oder Migrationszeiten, Mengen und Responsefaktoren, die zur Reporterstellung benötigt werden.

Der kalibrierte Report basiert auf zwei Kalibrierverfahren, externer oder interner Standard.

Report mit externem Standard

Der ESTD-Report erstellt eine Ergebnisliste mit Konzentrationseinheiten Ihrer Wahl oder Angaben der prozentualen Anteile an der Gesamtmenge der Substanzen. Das Verfahren des externen Standards erfordert die genaue Kenntnis der injizierten Volumina von Kalibrier- und Probenlösung. Die Verläßlichkeit dieses Reports hängt von der Reproduzierbarkeit der Injektionsvolumina und anderer Faktoren ab, die sich von Probe zu Probe ändern können.

Report mit internem Standard

Die Beschränkungen des Reports mit externem Standard entfallen bei der Verwendung eines internen Standards. Eine exakt bekannte Menge des internen Standards wird sowohl zur Kalibrierlösung, als auch zur Probenlösung gemischt. Die Responsefaktoren jeder interessierenden Substanz werden durch die Response des internen Standards dividiert, womit das Response-Verhältnis errechnet wird. Die Kalibrierkurven werden als Auftragung dieses Response-Verhältnisses gegen das Mengenverhältnis gewonnen. Mit dieser Information werden die Ergebnisse im Report berechnet. Mit diesem Verfahren werden Fehler des Injektionsvolumens oder leichte Schwankungen des chromatographischen Systems mit Auswirkungen auf alle Substanzen berücksichtigt. Im ISTD-Report werden die Ergebnisse mit Einheiten Ihrer Wahl ausgegeben.

Control Charts Report

Beim Control Charts Report wird ein einzelnes Ergebnis für eine bestimmte kalibrierte Substanz über mehrere Läufe hinweg verfolgt. Die Control Chart Funktion wird erst installiert, wenn die ChemStation betriebsbereit ist. Am Ende eines Laufes, dessen Methode diese Funktion beinhaltet, wird das verfolgte Ergebnis direkt in ein Microsoft Excel-Datenblatt überführt. Schließlich wird der Report auch über Excel ausgedruckt.

Quantitative Ergebnisse

Der Reporttyp trägt den Namen der Rechenmethode, die zur Auswertung verwendet wurde, zum Beispiel ISTD-Report. Jeder Typ wird unten kurz beschrieben. Die Rechenmethoden werden in Kapitel8 “Quantifizierung” ausführlich besprochen.

Area% (Flächen%) erzeugt den einfachsten Report und erfordert keine Kalibrierdaten, da keine Korrektur des Detektor-Response für unterschiedliche Substanzen erfolgt. Dieser Reporttyp kann zur Entwicklung einer Kalibriertabelle zur Verwendung mit anderen Reportoptionen genutzt werden. Dieser Report ist für Substanzen anwendbar, deren Responsefaktoren gleich sind.

Height% (Höhen%) ergibt einen Report ähnlich des Typs Area%, wobei anstelle der Peakfläche die Peakhöhe zur Berechnung verwendet wird.

Norm% ergibt einen Report, in dem jede Komponente als prozentualer Anteil an der Gesamtmenge ausgedrückt wird. Die Peaks werden vor der Berechnung hinsichtlich ihres Detektor-Response korrigiert.

ESTD (Externer Standard) ergibt einen Report der aktuellen Menge jeder Substanz in frei wählbaren Einheiten. Die Mengenberechnung erfolgt mit einer zuvor erstellten Kalibriertabelle. Die Verwendung eines externen Standards erfordert die Kenntnis des Injektionsvolumens der Kalibriermischung.

ESTD% erzeugt einen Report der relativen Mengen jeder Substanz als prozentualer Anteil der injizierten Probe. Die Mengenberechnung erfolgt mit einer zuvor erstellten Kalibriertabelle. Die Verwendung eines externen Standards erfordert die Kenntnis des Injektionsvolumens der Kalibriermischung.

ISTD (Interner Standard) erzeugt einen Report mit den aktuellen Mengen jeder Substanz. Die Mengen werden mit einer zuvor erstellen Kalibrierkurve berechnet. Die Verwendung eines internen Standards in der Probe und der Kalibriermischung erfordert keine so exakte Kontrolle des Injektionsvolumens. Diese Methode korrigiert Schwankungen der instrumentellen Leistungen zwischen einzelnen Analysenläufen.

ISTD% erzeugt einen Report mit den relativen Mengen jeder Substanz als prozentualer Anteil an der injizierten Probe. Die Verwendung eines internen Standards in der Probe und der Kalibriermischung erfordert keine so exakte

Kontrolle des Injektionsvolumens. Diese Methode korrigiert Schwankungen der instrumentellen Leistungen zwischen einzelnen Analysenläufen.

Reportvorlagen

Folgende Reportvorlagen sind verfügbar:

Sie können die gewünschte Reportvorlage durch Aktivieren des entsprechenden Ankreuzkästchens in “Specify Report” auswählen.

- **None (keiner)**Es wird keinerlei Text in den Report aufgenommen. Das Chromatogramm wird nur dann als Report ausgegeben, wenn die Option “Add Chromatogram Output” angewählt ist.
- **Short** (Kurz) besteht aus quantitativen Ergebnissen aller integrierten Signale, die im Dialogfeld “Signal Details” (nur bei LC) oder “Signal” (nur GC) aufgeführt sind.
- **Detail** (Genau) besteht aus Signalen, quantitativen Ergebnissen in Textform und Kalibrierkurven. Der Kopfteil stammt aus der Datei RPTHEAD.TXT im Methodenverzeichnis. Sie können den Kopfteil mit einem Texteditor an Ihre Methode anpassen.
- **Header + Short** (Kopfteil + Kurz) Besteht aus Kopfteil und quantitativen Ergebnissen. Der Kopfteil stammt aus der Datei RPTHEAD.TXT im Methodenverzeichnis. Sie können den Kopfteil mit einem Texteditor an Ihre Methode anpassen.
- **GLP + Short** (GLP + Kurz) besteht aus Kopfteil, Probeninformation, apparativen Bedingungen, Logbuch, Signal und quantitativen Ergebnissen. Der Kopfteil stammt aus der Datei RPTHEAD.TXT im Methodenverzeichnis. Sie können den Kopfteil mit einem Texteditor an Ihre Methode anpassen.
- **GLP + Detail** (GLP + Genau) besteht aus Kopfteil, Probeninformation, apparativen Bedingungen, Logbuch, Signal, Kalibrierkurven und quantitativen Ergebnissen. Der Kopfteil stammt aus der Datei RPTHEAD.TXT im Methodenverzeichnis. Sie können den Kopfteil mit einem Texteditor an Ihre Methode anpassen.
- **Full** (Vollständig) besteht aus Kopfteil, Probeninformation, apparativen Bedingungen, Logbuch, Signale und quantitativen Ergebnissen. Der Kopfteil stammt aus der Datei RPTHEAD.TXT im Methodenverzeichnis. Sie können den Kopfteil mit einem Texteditor an Ihre Methode anpassen.
- **Performance** (Systemleistung) produziert einen Report gemäß der Grenzen aus dem Dialogfeld “Edit Performance Limits” aus dem Menü

"System Suitability".

Bei unkalibrierten Reports enhalten die Reportparameter die Peaknummer, Retentions- bzw. Migrationszeit, Peakfläche, Peakhöhe, Signalbeschreibung, wahre Halbwertsbreite (siehe auch Wahre Peakbreite Wx [min]auf Seite 274), Symmetrie, k', Effizienz (Anzahl Trennböden) und Auflösung für jeden Peak.

Für kalibrierte Methoden besteht der Report aus Peaknummer, Retentions- bzw. Migrationszeit, Substanzname, Menge, Signalbeschreibung, wahre Halbwertsbreite, Symmetrie, k', Effizienz (Anzahl Trennböden) und Auflösung für jeden Peak.

Die Halbwertsbreite wird an den Wendepunkten der Peakflanke berechnet und nicht mit der komplexeren Formel des Integrators. Die Werte für Effizienz und Auflösung basieren auf dieser berechneten Halbwertsbreite. Der Kopfteil des Reports umfaßt alle relevanten Informationen zur Methode, einschließlich Analysengerät, Säule/Kapillare, Probe und Parameter der Datenerfassung. Auch das Signal wird dargestellt.

- **Performance + Noise** (Systemleistung + Rauschen) kombiniert die Reportvorlage 'Systemleistung' mit Berechnungen zum Rauschen für einen Bereich, der im Dialogfeld "Edit Noise Range" aus dem Menü "System Suitability" festgelegt wird. Zusätzlich wird das Rauschen als sechsfache Standardabweichung, Peak zu Peak und als ASTM-Rauschen angegeben. Drift und Abweichungen werden ebenfalls bestimmt.
- **Performance + Extended** (Systemleistung + Erweitert) erzeugt einen erweiterten Report mit allen Parametern aus den Leistungsberechnungen der Peaks und einzelnen Peakdarstellungen. Die Darstellungen umfassen die Basislinie, die Tangenten und die Peakbreiten in definierten Höhen. Dieser Reporttyp berücksichtigt nur kalibrierte Peaks.

  Zusätzlich zu den Parametern, die für den Performance Report ausgedruckt werden, werden weitere Parameter zur Peakleistung bestimmt: Anfangs- und Endzeiten des Peaks, Verzerrung, Überschuß, Peakbreite, USP für das Peaktailing, Zeitintervall zwischen Datenpunkten, Anzahl der Datenpunkte, statistische Momente, Anzahl der Trennstufen, Trennstufen pro Meter, Selektivität und Peakauflösung werden mit ausgedruckt. Die Peakbreite, Anzahl Trennböden, Trennböden pro Meter, Selektivität und Auflösung werden mit der wahren Halbwertsbreite-, 5 Sigma-, Tangenten- und Tailing-Methode berechnet (genauere Beschreibungen finden Sie unter Definitionen des Leistungstestsauf Seite 272).

Der Kopfteil des Reports umfaßt alle relevanten Informationen zur Methode, einschließlich Analysengerät, Säule/Kapillare, Probe und Parameter der Datenerfassung, das Signal wird ebenfalls dargestellt. Eine vollständige Liste der Algorithmen zur Berechnung der Leistungsparameter finden Sie unter “Definitionen des Leistungstests” auf Seite 272.

Die Spektrenreportvorlagen (**Short + Spectrum (Kurz + Spektrum)**, **Detail + Spectrum (Ausführlich + Spektrum)**, **Performance + Library Search (Leistungsfähigkeit + Bibliothekssuche)**) sind bei *Informationen zu Ihrem Spektrenmodul* beschrieben.

Hinzufügen eines individuellen Reports zu den Reportvorlagen

Sie können zur Liste der verfügbaren Reportvorlagen eine individuelle Reportvorlage hinzufügen, die Sie in der Ansicht "Report Layout" der ChemStation erstellen können.

HINWEIS

Bei alle Reports ausser der Leistungsfähigkeitsreports sind die aufgelisteten Peakbreiten vom Integrator mit einer komplexeren Formel berechnet worden (genauere Informationen zur Peakbreitenberechnung finden Sie unter Peakbreite (Peak Width)auf Seite 91).

Weitere Parameter für die Reportvorlagen

Summed Peaks Table

Die Tabelle der Peaksummen existiert für einige Anwendungen der petrochemischen und pharmazeutischen Industrie und dient der vereinfachten Durchführung folgender Schritte:

- Addition der Peakflächen, die innerhalb eines benutzerdefinierten Bereiches liegen
- Addition der Flächen eines Peakbereiches und Berechnung mit einem einzigen Multiplikator
- Addition der Flächen aller Peaks mit gleichem Namen

Wenn der Report erstellt ist, verwendet die ChemStation die Tabelle der Peaksummen dazu, den Peaksummenreport zu generieren. Die Berechnungen erfolgen analog dem Standardreport, außer daß Norm% durch den Peaksummenreport ersetzt ist.

Reportvorlage für unkalibrierte Peaks

Wenn Sie die Reportvorlage für unkalibrierte Peaks verändern wollen, müssen Sie einen der folgenden Reports im Dialogfeld "Specify Report" auswählen.

- Über "Separately" werden die unkalibrierten Peaks in einer gesonderten Tabelle (wenn die Peaks nach der Retentionszeit sortiert sind) oder in getrennten Tabellen (wenn die Peaks nach dem Signal sortiert sind) im Report aufgeführt.
- Über "With Calibrated Peaks" werden die unkalibrierten Peaks zusammen mit den kalibrierten Peaks im Report aufgeführt.
- Über "Do Not Report" werden die unkalibrierten Peaks gar nicht in den Report aufgenommen.

Reportausgabe

Der Report kann an folgende Stellen ausgegeben werden:

- Bildschirm

  Ein Report (bestehend aus Text und Graphiken) wird auf dem Bildschirm im Fenster des Reportanzeigers dargestellt und kann von dort aus gedruckt werden.

- Drucker

  Ein Report, der aus Text und Grafik besteht, wird auf dem aktuellen Drucker ausgegeben.

- Datei

  Der Report wird in eine Datei gesichert. Nachdem Daten in einer Datei gespeichert wurden, ist eine Nachbearbeitung der Daten mit einem anderen Programm, zum Beispiel Microsoft EXCEL möglich.

Dateiformate für Reports

Jeder Report kann in vier verschiedenen Formaten gespeichert werden. Jedes Format weist eine eigene Dateinamenerweiterung auf. Es ist möglich, mehr als ein Format für einen Report zu wählen.

.TXT	Der Text des Reports wird als ASCII-Textdatei gedruckt.
.WMF	Jede Grafik eines Reports (Signal oder Kalibrierkurve) wird als Microsoft Windows Metadatei (WMF) gesichert. Es können mehrere Metadateien für einen Report gespeichert werden. Dieses Dateiformat entspricht dem Microsoft Standard für das Metadateiformat gemäß der Dokumentation zur Windows Softwareentwicklung. Diese Dateien sind mit dem Format der Aldus Placeable Metafiles (APM) kompatibel, das von einer Reihe von Softwarepaketen unterstützt wird.
.DIF	Tabellarische Reportdaten werden im Data Interchange Format (DIF) gespeichert. Dieses Format wird von Tabellenkalkulationsprogrammen wie Microsoft Excel unterstützt. Unabhängig vom gewählten Reportformat werden nur die Informationen der Reportvorlage „Short"

gespeichert.

.CSV Dieses Format heißt Comma Separated Values (CSV, Werte mit Kommatrennung). Es ist ein sehr einfaches Format für tabellarische Daten und wird von vielen Tabellenkalkulationsprogrammen und Datenbanken akzeptiert. Unabhängig vom gewählten Reportformat werden nur die Informationen der Reportvorlage „Short" gespeichert.

Für einen Report können mehrere Dateien der Formate .DIF und .CSV angelegt werden. Für jeden Reportblock enthält die erste Datei, zum Beispiel REPORT00.CSV den Kopfteil. Die nachfolgenden Dateien enthalten die tabellarischen Ergebnisse.

Wenn die Ergebnisse nach Retentions- bzw. Migrationszeit sortiert werden, ist nur eine Datei für die vollständige Tabelle erforderlich, zum Beispiel REPORT01.CSV.

Wenn die Ergebnisse nach dem Signal sortiert werden, ist für jedes Signal eine getrennte Tabelle erforderlich. In diesem Fall lautet die Namensgebung Report01.CSV bis ReportNN.CSV, wobei NN die Nummer des Signals ist.

.XLS Der Report wird in das XLS-Format der Tabellen von Microsoft Excel exportiert. Die Daten müssen im Allgemeinen nachbearbeitet werden.

Sequence Summary Reporting

Überblick

Die ChemStation kann verschiedene Standardreports für einzelne Analysenläufe ausgeben. Der zusammenfassende Report einer Sequenz ist eine weitere Möglichkeit der Reporterstellung und ermöglicht Ihnen, Berechnungen und Parameterausgaben über mehrere Analysen zu erstellen. Das ist zum Beispiel als Beleg der Stabilität des Instrumentes oder einer neuen Methode erforderlich.

Ein zusammenfassender Report kann folgende Bestandteile aufweisen:

- Eine Titelseite
- Konfiguration der Analysengeräte einschließlich Revisionsnummer von Gerät und Einzelheiten zur analytischen Säule/Kapillare
- Eine Sequenztabelle mit einer Beschreibung des vorgesehenen Ablaufs der automatischen Analysen
- Logbucheinträge mit einer Beschreibung des Ablaufes der Sequenz mit unerwarteten Ereignissen, die während des Ablaufes auftraten
- Eine Methodenliste
- Einzelreports für jede Probe
- Eine statistische Auswertung der Analysen mit auszuwählenden Kriterien—S*tatistische Daten werden nur für kalibrierte Substanzen* errechnet
- Ein Inhaltsverzeichnis mit Querverweisen auf die Seitennummern der Abschnitte mit detaillierten Informationen

Erstellung eines zusammenfassenden Reports für Sequenzen

Bei der Erstellung eines zusammenfassenden Reports für Sequenzen können Sie beliebige Kombinationen der folgenden neun Kategorien wählen, indem Sie die entsprechenden Ankreuzkästchen aktivieren und, wo möglich, eine Reportvorlage mit der Auswahl “Template” vornehmen. Jede Vorlage spezifiziert Inhalt und Layout des bestimmten Abschnittes des zusammenfassenden Reports.

Sie können unter folgenden Reportvorlagen für zusammenfassende Reports wählen:

- **One Page Header (Kopfzeilen auf einer Seite)**

  Die Vorlage GLP druckt GLP mit großen Buchstaben als Titelseite für den folgenden Report. Datum und Platz für eine Unterschrift sind vorgesehen.

- **Configuration (Konfiguration)**

  Mit der Wahl von “Configuration” können Sie die Gerätekonfiguration und die Daten der analytischen Säule/Kapillare in den Report aufnehmen.

- **Sequence Table (Seqzuenztabelle)**

  Mit der Wahl von “Sequence table” können Sie eine Probenliste, Parameter zur Quantifizierung und Methodennamen im Report aufnehmen. Diese Liste umfaßt die vorgesehenen Aufgaben des Systems.

- **Logbook (Logbuch)**

  Mit der Wahl von “Logbook” können Sie eine Liste mit den vermessenen Proben, den Gerätebedingungen und allen unerwarteten Ereignissen während der Messungen erstellen.

- **Methods (Methoden)**

  Mit der Wahl von “Methods” können Sie eine Liste aller Methoden, die in einer Serie von Messungen benutzt wurden, erstellen.

- **Analysis Reports (Analysenreports)**

  Mit der Wahl von “Analysis reports” erhalten Sie Reports der einzelnen Analysen gemäß der in der Methode gewählten Vorlage.

  Einzelne Analysenreports können nach jeder Analyse mit der gewählten Reportvorlage der Methode ausgedruckt werden. Dies erfolgt zusätzlich zu den Reportabschnitten des zusammenfassenden Reports der Sequenz. Siehe “Sequence Output (Spezifikationen zur Ausgabe)” auf Seite 258.

- **Statistics for Calibrated and Sample Runs (Statistik für Standards und Analysen)**

  Mit der Wahl von “Statistics cal. runs” werden statistische Trendanalysen der Kalibrierproben erzeugt. Mit der Wahl von “Statistics sample runs” werden statistische Trendanalysen für die unbekannten Proben erstellt.

  Beide Wahlmöglichkeiten bieten die Gestaltungsvorlagen “Standard -Statistic” und “Extended Statistic”. Extended Statistics druckt die statistischen Trends der Analysen graphisch, Standard Statistics druckt

nur Text. Die Auswahl des Dialogfeldes “Items and Limits for Extended Statistics” werden nur bei Wahl der Option “Extended Statistic” im Dialogfeld “Sequence Summary Parameters” verwendet.

Bei Wahl der Option “Standard Statistic” im Dialogfeld “Sequence Summary Parameters” werden folgende statistische Auswertungen angeboten:

Retentions- bzw. Migrationszeit
Fläche
Höhe
Menge
Halbwertsbreite des Peaks
Symmetrie

Die statistische Auswertung unterscheidet nicht zwischen verschiedenen Kalibrierpunkten in einer Sequenz mit Mehrpunktkalibrierung. Das bedeutet, daß konzentrationsabhängige Angaben (Fläche, Höhe, Menge, siehe Dialogfeld zu Angaben und Grenzen von Extended Statistics) gemeinsam betrachtet werden. Die Werte von „Statistics for Calibration Runs" sind bei Mehrpunktkalibrierungen in Sequenzen daher nicht anwendbar.

- **Summary (Zusammenfassung)**

  Die Wahl von “Summary” druckt eine Übersicht über die analysierte Probenreihe und die verwendeten Methoden. Wenn “Summary” zusammen mit anderen Wahlmöglichkeiten aus “Sequence Summary” gewählt wird, werden Verweise mit Seitenzahlen auf andere Teile der Zusammenfassung eingefügt.
  Es sind zwei Vorlagen für “Summary” verfügbar:

  “Sample Summary” präsentiert die Analysenläufe der Sequenz tabellarisch mit Probeninformationen, wie Probenname, Name des Datensatzes, Methode und Nummer des Probenfläschchens.

  “Compound Summary” faßt die Ergebnisse tabellarisch zusammen und nennt Ergebnisse der Quantifizierung für jede kalibrierte Komponente oder für jeden Peak, was von dem in der Methode festgelegten Report abhängt.

- **Sequence Output (Spezifikationen zur Ausgabe)**

  Im Dialogfeld “Sequence output” können Sie auch festlegen, wohin der Summmary-Report der Sequenz gedruckt werden soll.

Die Wahl von “Report to file” und Eingabe eines Dateinamens sichert den Report in dieser Datei. Die Standardeinstellung ist die Ausgabe in die Datei GLPrprt.txt. Bei GC-Systemen mit Dual-Injektion werden die Dateien GLPrptF.txt und GLPrptB.txt für den vorderen bzw. hinteren Injektor angelegt.

Durch die Wahl von “Report to printer” wird der Report auf dem aktiven Drucker des Systems ausgedruckt.
“Print individual reports for each run” aktiviert auch das Drucken von Reports nach jeder Analyse. Diese Reports werden zusätzlich zu den zusammenfassenden Reports am Ende der Sequenz ausgegeben. Sie können für diesen Ausdruck ein neues Ausgabeziel im Dialogfeld “Sequence Output” angeben oder das Ausgabeziel verwenden, das in der einzelnen Methode bestimmt wurde.

13

Ermittlung der Systemleistung

Ermittlung der Systemleistung

Es ist Bestandteil der guten Laborpraxis, die Leistungsfähigkeit von Analysengerät und Methode vor der Vermessung von Proben und dem Routineeinsatz zu überprüfen. Dazu zählt auch die Überprüfung des Analysensystems vor, während und nach Routineanalysen. Die ChemStation Software bietet Hilfsmittel zur automatischen Durchführung dieser drei Tests. Der Test eines Analysengerätes kann die Überprüfung der Detektorempfindlichkeit, die Reproduzierbarkeit von Retentionszeiten und Peakflächen umfassen. Der Test einer Methode kann die Überprüfung der Reproduzierbarkeit von Retentionszeiten und berechneten Mengen, die Selektivität und die Stabilität der Methode hinsichtlich Abweichungen im täglichen Einsatz umfassen. Ein Systemtest kann die Überprüfung der berechneten Mengen, die Auflösung zwischen zwei bestimmten Peaks und des Tailings umfassen.

Laboratorien, die nach den Vorschriften der

- GLP (Good Laboratory Practice),
- GMP (Good Manufacturing Practice) und cGMP (Current Good Manufacturing Practice) oder
- GALP (Good Automated Laboratory Practice)

arbeiten, sollten diese Tests durchführen und sämtliche Ergebnisse dokumentieren. Laboratorien, die einem Qualitätssicherungssystem, zum Beispiel nach ISO9000 unterliegen, müssen die korrekte Funktion ihrer Analysengeräte dokumentieren.

Die ChemStation sammelt Ergebnisse aus mehreren Analysenläufen und wertet diese im zusammenfassenden Report einer Sequenz statistisch aus.

Die Testergebnisse werden in einer Form dokumentiert, die von behördlichen Stellen oder von unabhängigen Auditoren akzeptiert werden. Die statistischen Daten umfassen:

- Retentionszeiten der Peaks
- Peakflächen
- Berechnete Mengen
- Peakhöhe

- Peakbreite in halber Höhe
- Peaksymmetrie
- Peaktailing
- Kapazitätsfaktoren (k´)
- Anzahl theoretischer Trennstufen
- Auflösung zwischen Peaks
- Selektivität relativ zu einem vorausgegangenen Peak
- Verzerrung
- Überschuß

Der Mittelwert, die Standardabweichung, die relative Standardabweichung und die Konfidenzintervalle werden berechnet. Sie können Grenzwerte entweder für die Standardabweichung, die relative Standardabweichung oder die Konfidenzintervalle dieser Parameter angeben. Sollten die Werte die vorgegebenen Grenzwerte überschreiten, werden entsprechende Anmerkungen zur besonderen Beachtung im Report aufgenommen.

Die Qualität der analytischen Daten kann mit Aufzeichnungen der Meßbedingungen zum Analysenzeitpunkt belegt werden. Die ChemStation trägt die apparativen Bedingungen vor und nach einem Analysenlauf in ein Logbuch ein. Diese Informationen werden zusammen mit den Daten gespeichert und in Reports aufgenommen. Daten zur Beschreibung der Geräteleistung werden während des gesamten Analysenlaufes aufgezeichnet und im Datensatz gespeichert. Diese Gerätedaten können, wenn vom Analysengerät unterstützt, dem Chromatogramm bzw. Elektropherogramm unterlegt werden und bei Bedarf, zum Beispiel einem Audit abgerufen werden.

Basislinienrauschen und Drift können automatisch gemessen werden. Damit kann über die Peakhöhe eine Nachweisgrenze für jede kalibrierte Substanz der Methode berechnet werden.

Schließlich können die Gerätekonfiguration, die Seriennummern der Geräte, die Säulenkennung und Ihre eigenen Kommentare in jeden Report aufgenommen werden.

Erweiterte Leistungswerte können nur für kalibrierte Substanzen berechnet werden, womit die Identifizierung über Retentions- bzw. Migrationszeiten und mit Substanznamen sichergestellt wird.

Ein typischer Report über einen Systemleistungstest umfaßt Ergebnisse zu folgenden Leistungsprüfungen:

- Details zu den Analysengeräten
- Details zur Trennsäule/Kapillare
- Die analytische Methode
- Informationen zur Probe
- Informationen zur Datenerfassung
- Signalbeschreibung und Bestimmung des Basislinienrauschens
- Beschriftung von Chromatogramm/Elektropherogramm mit Retentions-/Migrationszeiten und Substanznamen.

Zusätzlich werden folgende Informationen für jede kalibrierte Substanz in das Chromatogramm/Elektropherogramm aufgenommen:

- Retentions-/Migrationszeiten
- k´
- Symmetrie
- Peakbreite
- Anzahl der theoretischen Trennböden
- Auflösung
- Verhältnis von Signal zu Rauschen
- Substanznamen

Bestimmung des Rauschens

Die Rauschhöhe wird aus den Daten eines Zeitintervalls im Chromatogramm/Elektropherogramm bestimmt. Rauschen kann auf drei Arten beschrieben werden:

1. Als sechsfache Standardabweichung aus der linearen Regression der Drift
2. Als Peak-zu-Peak Wert (mit Driftkorrektur)
3. Durch Bestimmung mit der ASTM-Methode (ASTM E 685-93).

Abbildung 42 **Bestimmung des Rauschens als sechsfache Standardabweichung**

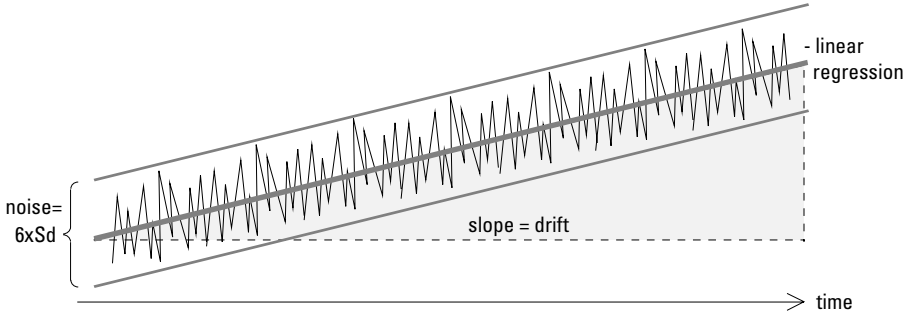
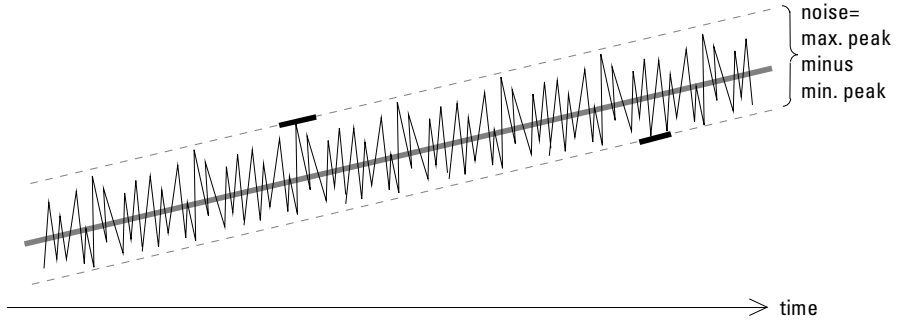
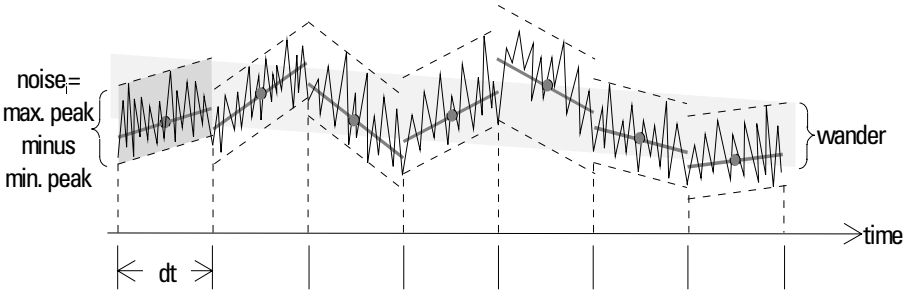


Abbildung 43 **Bestimmung des Rauschens als maximaler Peak-zu-Peak Spitzenabstand**



Die Drift wird als Steigung der Regressionsgeraden gemäß Abbildung 42 ermittelt. Die mittlere Abweichung wird gemäß Abbildung 44 als Peak-zu-Peak Rauschhöhe der Mittelwerte der ASTM-Abschnitte bestimmt.

Abbildung 44 **Bestimmung des Rauschens mit der ASTM-Methode**



Die Bestimmung des Rauschens mit der ASTM-Methode (ASTM E 685-93) basiert auf einem Standardverfahren zum Testen von Detektoren variabler Wellenlänge nach einer Definition der American Society for Testing and Materials. Es werden drei Typen von Rauschen nach dem Zeitintervall zur Bestimmung unterschieden. Die Bestimmung von Rauschen basiert auf der Messung der Abstände von Peak-zu-Peak innerhalb bestimmter Zeitintervalle.

1. Langzeitrauschen—Es ist die maximale Amplitude aller zufälligen Schwankungen des Detektorsignals mit Frequenzen von 6 bis 60 Zyklen pro Stunde. Langzeitrauschen wird in einem Zeitintervall bestimmt, das länger als eine Stunde ist. Die Zeitintervalle für jeden Zyklus (dt) werden auf 10 Minuten eingestellt, so daß im gewählten Zeitbereich mindestens sechs Zyklen erfaßt werden.

2. Kurzzeitrauschen—Es ist die maximale Amplitude aller zufälligen Schwankungen des Detektorsignals mit einer Frequenz von mehr als einem Zyklus pro Minute.
   Kurzzeitrauschen wird in einem Zeitintervall zwischen 10 und 60 Minuten bestimmt. Als Zeitintervall eines Zyklus (dt) wird eine Minute gewählt, so daß im gewählten Zeitbereich mindestens 10 Zyklen erfaßt werden.

3. Schnelles Kurzzeitrauschen (kein Bestandteil von ASTM E 685-93)—Diese Definition wird zur Beschreibung der maximalen Amplitude aller zufälligen Schwankungen des Detektorsignals mit einer Frequenz von mehr als einem Zyklus in 0,1 Minuten eingeführt. Schnelles Kurzzeitrauschen wird in einem Zeitintervall zwischen 1 und 10 Min. bestimmt. Als Zeitintervall eines Zyklus (dt) wird eine Minute gewählt, so daß im gewählten Zeitbereich mindestens 10 Zyklen erfaßt werden.

Eine Bestimmung des Rauschens nach ASTM wird nicht durchgeführt, wenn der gewählte Zeitbereich kürzer ist als eine Minute. Bei gewählten Zeitintervallen von größer oder gleich einer Minute wird die Rauschhöhe mit

einer der oben beschriebenen ASTM-Methoden beschrieben. In jedem Zyklus werden mindestens sieben Datenpunkte zur Berechnung verwendet. Die Zyklen in der automatischen Bestimmung der Rauschhöhe überlappen um 10 %.

Berechnung der Peaksymmetrie

Die ChemStation führt keine Bestimmung der Peakasymmetrie durch Vergleich der halben Peakbreiten in 10 %, oder wie von der FDA empfohlen, in 5 % der Peakhöhe durch.

Die Peaksymmetrie wird vom Integrator als Pseudomoment mit folgenden Gleichungen berechnet:

$$m_1 = a_1\left(t_2 + \frac{a_1}{1.5H_f}\right)$$

$$m_2 = \frac{a_2^2}{0.5H_f + 1.5H}$$

$$m_3 = \frac{a_3^2}{0.5H_r + 1.5H}$$

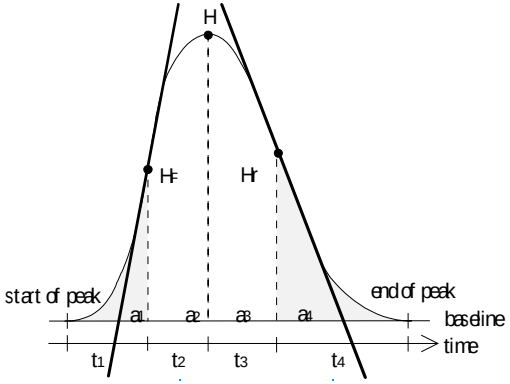
$$m_4 = a_4\left(t_3 + \frac{a_4}{1.5H_r}\right)$$

$$\text{Peak symmetry} = \sqrt{\frac{m_1 + m_2}{m_3 + m_4}}$$

Wenn nur ein Wendepunkt oder keine Wendepunkte gefunden werden, dient folgende Formel zur Berechnung der Peaksymmetrie:

$$\text{Peak symmetry} = \frac{a_1 + a_2}{a_3 + a_4}$$

Abbildung 45 **Berechnung der Peaksymmetrie**



mit:

a_i = Flächenwert des Abschnittes

t_i = Zeit des Abschnittes

H_f = Höhe des vorderen Wendepunktes

H_r = Höhe des hinteren Wendepunktes

H = Höhe im Maximum

Formeln und Rechenmethoden zur Beurteilung der Systemleistung

Die ChemStation verwendet die folgenden Formeln zur Berechnung der Systemleistung in den verschiedenen Tests. Die Ergebnisse werden in den Reportvorlagen “Performance”, “Performance + Noise” und “Performance + Extended” eingebunden.

Wenn in einer gegebenen Definition ASTM oder USP angegeben wird, entsprechen die Definitionen der Referenz. Es ist jedoch zu beachten, daß die hier verwendeten Symbole von jenen der Referenzen abweichen können.

Die beiden Referenzen in diesem Zusammenhang sind:

1 *ASTM: Abschnitt E 682 – 93, Jahrbuch der ASTM Standards, Band.14.01*

2 *USP: Die Pharmacopeia der Vereinigten Staaten, XX. Version, pp. 943 - 946*

Allgemeine Definitionen

Totvolumen

$$V = d^2 \pi l (f/4)$$

mit:

d = Durchmesser der Säule [cm]

π = Konstante; Wert für das Verhältnis von Durchmesser zu Fläche eines Kreises

l = Säulenlänge [cm]

f =Anteil am Säulenvolumen, das nicht durch die stationäre Phase ausgefüllt wird und mobile Phase aufnehmen kann; Standardwert beträgt: f = 0,68 (für Hypersil)

Retentionszeit einer nicht retardierten Substanz T (m) [min]

(Andere Bezeichnung Totzeit oder Nullzeit)

$$T_m = V/F$$

mit:

F = Flußrate der mobilen Phase der LC [ml/min]

Definitionen des Leistungstests

Statistische Momente

$$M0 = d_t \cdot X$$

$$M1 = t_0 + d_t \cdot \frac{X}{Y}$$

$$M2 = \frac{d_t^2}{X} \cdot \sum_{i=1}^{N} \left(\left(i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^2 \cdot A_i \right)$$

$$M3 = \frac{d_t^3}{X} \cdot \sum_{i=1}^{N} \left(\left(i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^3 \cdot A_i \right)$$

$$M4 = \frac{d_t^4}{X} \cdot \sum_{i=1}^{N} \left(\left(i - 1 - \frac{Y}{X} \right)^4 \cdot A_i \right)$$

mit:

N = Anzahl der Flächenabschnitte

A_i = Fläche des Abschnitts i

$\sum_{i=1}^{N}$ = Summenbildung über die Einzelbeobachtungen mit dem Index 1 bis zum letzten Index N

d_t = Zeitintervall zwischen benachbarten Flächenabschnitten der Peakfläche

t_0 = Zeit des ersten Flächenabschnittes der Peakfläche

$X = \sum_{i=1}^{N} (A_i)$

$$Y = \sum_{i=1}^{N} ((i-1)A_i)$$

Statistische Momente, Verzerrung (Skew) und Überschuß (Excess)

Die statistischen Momente werden zur Beschreibung asymmetrischer Peakformen verwendet. Es existiert eine unendliche Anzahl statistischer Momente zu einem Peak, es werden jedoch nur die ersten fünf zur Beschreibung chromatographischer Peaks verwendet.
Diese werden das **0. Moment, 1. Moment**, … **4. Moment** genannt.

Das **0. Moment** repräsentiert die Peakfläche.

Das **1. Moment** repräsentiert die mittlere Retentionszeit, gemessen am Peakschwerpunkt. Dies unterscheidet sich von der chromatographischen Retentionszeit, die am Peakmaximum gemessen wird, vorausgesetzt es handelt sich um einen symmetrischen Peak.

Das **2. Moment** ist eine Repräsentation der Peakvarianz, die ein Maß für die Peakerweiterung ist. Es ist eine Summe der Varianzen aus verschiedenen Beiträgen der Analysengeräte.

Das **3. Moment** beschreibt die vertikale Symmetrie oder Verzerrung. Es ist ein Maß für die Abweichung der Peakform von der idealen Gaußform. Die Verzerrung wird im Report “Performance & Extended” zusätzlich dimensionslos angegeben.
Ein symmetrischer Peak hat eine Verzerrung von Null. Peaks mit Tailing haben eine positive Verzerrung mit einem 1. Moment, das größer als die Retentionszeit ist. Peaks mit Fronting haben eine negative Verzerrung und ihr 1. Moment ist kleiner als die Retentionszeit.

Das **4. Moment** oder der Überschuß ist ein Maß für die Stauchung oder Zerrung eines Peaks längs einer vertikalen Achse als Vergleich zur idealen Gaußform, die ein 4. Moment von Null aufweist. Eine visuelle Vergleichsdarstellung wäre das Verschieben der Seiten eines Gaußpeaks bei konstanter Fläche. Wenn ein Peak in diesem Vergleich „komprimiert" wird, weist er einen negativen Überschuß auf. Wenn er höher und schmaler wird, ist der Überschuß positiv. Der Wert des Überschusses wird im Report “Performance & Extended” als dimensionsloser Wert präsentiert.

Wahre Peakbreite W_x [min]

W_x = width of peak at height x % of total height

Spezialfälle:

W_B	Basisbreite, 4 Sigma, wird erhalten, indem Tangenten durch die Wendepunkte gelegt werden, die die Basislinie schneiden (*Tangenten-Peakbreite*) siehe Abbildung 46 auf Seite 275)
$W_{4,4}$	Breite bei 4,4% der Höhe (*5 Sigma Breite*)
$W_{5,0}$	Breite bei 5% der Höhe (*Tailing Peakbreite*), wird für den USP Tailingfaktor verwendet
$W_{50,0}$	Breite bei 50% der Höhe (*wahre Peakbreite bei halber Höhe* oder *2,35 Sigma*). Detaillierte Informationen finden Sie in Abbildung 46.

Kapazitätsfaktor (USP), Kapazitätsverhältnis (ASTM) k′

$$k' = \frac{T_R - T_0}{T_0}$$

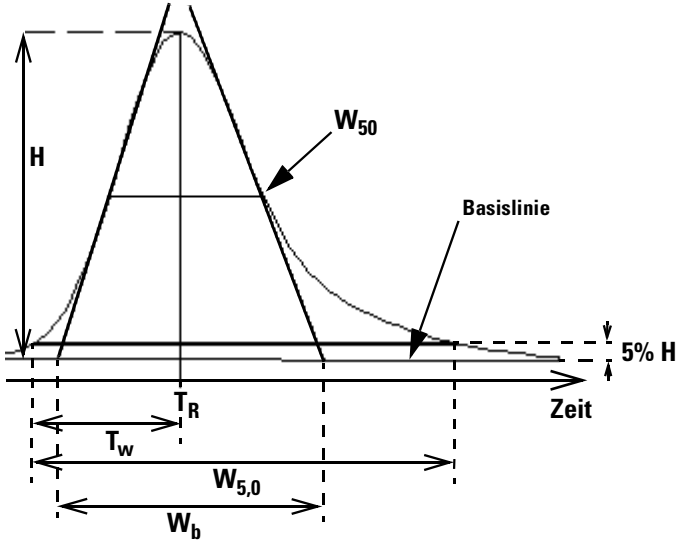
mit:
T_R = Retentionszeit des Peaks [min]
T_0 = Nullzeit [min]

Peaktailing nach USP t

$$t = \frac{W_{5.0}}{t_w \cdot 2}$$

wobei:
t_w = Abstand in min zwischen der Peakfront und T_R, gemessen bei 5% der Peakhöhe (siehe Abbildung 46)
$W_{5,0}$ = Peakbreite bei 5% der Peakhöhe [min]

Abbildung 46 **Leistungsparameter**



Anzahl der theoretischen Trennstufen der Säule (USP, ASTM) n

Tangentenmethode (USP, ASTM):

$$n = 16\left(\frac{T_R}{W_B}\right)^2$$

wobei:
W_B = Basisbreite [min] (siehe Abbildung 46 auf Seite 275)

Methode unter Verwendung der Halbwertsbreite (ASTM):

$$n = 5.54\left(\frac{T_R}{W_{50}}\right)^2$$

wobei:
W_{50} = Peakbreite bei halber Höhe [min] (siehe Abbildung 46 auf Seite 275)

Methode unter Verwendung von 5Sigma:

$$n = 25\left(\frac{T_R}{W_{4.4}}\right)^2$$

wobei:
$W_{4,4}$ = Peakbreite bei 4,4% der Peakhöhe [min]

Methode unter Verwendung der Varianz:

$$n = \frac{M1^2}{M2}$$

wobei:
Mx = x th statistischer Moment (Siehe auch Statistische Momenteauf Seite 272)

Anzahl der theoretischen Trennböden pro Meter N [1/m]

$$N = 100^{\frac{n}{l}}$$

wobei:
n = Anzahl theoretischer Böden
l = Säulenlänge [cm]

Relative Retention (USP, ASTM), Selektivität Alpha

(Bezogen auf zwei Peaks a und b, mit T_R des Peaks a < T_R des Peaks b)

$$\text{alpha} = \frac{k'_{(b)}}{k'_{(a)}}, \text{alpha} \geq 1$$

mit:

$k'_{(x)}$ = Kapazitätsfaktor des Peaks x

wobei Auflösung (USP, ASTM) R

(bezogen auf Peaks a und b, T_R von Peak a < T_R von Peak b; T_R in min)

Tangentenmethode (USP, ASTM):

$$R = \frac{2(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{B(b)} + W_{B(a)}}$$

Methode unter Verwendung von 5 Sigma:

$$R = \frac{2.5(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{4.4(b)} + W_{4.4(a)}}$$

Methode unter Verwendung der Halbwertsbreite:

$$R = \frac{(2.35/2)(T_{R(b)} - T_{R(a)})}{W_{50(b)} + W_{50(a)}}$$

Statistische Methode:

$$R = \frac{M1_{(b)} - M1_{(a)}}{W_{S(b)} + W_{S(a)}}$$

mit:

$M1_{(x)}$=mittlere Retentionszeit für Peak x (1. statistischer Moment) [min]

$W_{B(x)}$= Basisbreite von Peak x [min]

$W_{4,4(x)}$= Breite bei 4,4% Höhe für Peak x [min]

$W_{50(x)}$= Breite bei 50% Höhe für Peak x [min]

$W_{S(x)}$=Breite erhalten aus statistischen Momenten = $\sqrt{(M2)}$ für Peak x (Siehe auch Statistische Momenteauf Seite 272) [min]

Definitionen der Reproduzierbarkeit

Für die statistische Betrachtung der Analysendaten mit Hinblick auf die Reproduzierbarkeit, wird die Sequenz als eine kleine, zufällig aus einer unendlichen Anzahl möglicher experimenteller Ergebnisse herausgenommene Probe betrachtet. Um einen kompletten Ergebnissatz zu erreichen, bräuchte man eine unbegrenzte Menge Probenmaterial und Zeit. Strikte statistische Daten beziehen sich ausschließlich auf einen kompletten, in sich selbst geschlossenen Satz oder Datenpopulation. Aus diesem Grund ist die Voraussetzung für solch eine Datenbehandlung, dass die ausgewählte Probe als repräsentativ für alle Daten betrachtet werden kann.

Probenmittelwert M

Der Mittelwert M einer zufällig ausgewählten Probe, die N mal gemessen wurde, wird aus diesem begrenzten Satz von N einzeln ermittelten Werten X_i (mit dem Index i als fortlaufendem Zähler) entsprechend folgender Formel berechnet:

$$M = \frac{\sum_{i=1}^{N} X_i}{N}$$

mit:

N = Anzahl der Einzelbeobachtungen

X_i = Wert der Einzelbeobachtung mit dem Index i

Probe Standardabweichung S

Eine zufällige Probe der Größe N wird angenommen. Die Proben-Standardabweichung S für die ausgewählte begrenzte Probe aus der großen Datenpopulation wird ermittelt durch

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} (X_i - M)^2}{N - 1}}$$

Die Proben-Standardabweichung S unterscheidet sich in zwei Punkten von der Standardabweichung s für die gesamte Population:

- anstelle des wirklichen Mittelwertes wird nur der Proben-Mittelwert M verwendet und
- die Division durch N-1 anstelle von N.

Relative Standardabweichung RSD[%] (USP)

Die relative Standardabweichung ist definiert als

$$RSD = 100\frac{S}{M}$$

Standardabweichung des Mittelwertes S_M

M stellt den Probenmittelwert dar und S die Proben-[oder (N-1)]-Standardabweichung. Die Standardabweichung S_M vom Probenmittelwert M wird folgendermaßen ermittelt

$$S_M = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

Beispiel

Dies kann durch ein Beispiel verdeutlicht werden:

Während die Retentionszeit einer bestimmten Substanz während einer Sequenz leicht vom berechneten Mittelwert abweichen kann, können die Daten einer anderen Sequenz z.B. durch Umgebungstemperaturänderungen, Abbau des Säulenmaterials mit der Zeit u.s.w. viel mehr differieren. Um diese Abweichung zu bestimmen, kann die Standardabweichung des Probenmittelwertes S_M mit der oben genannten Formel berechnet werden.

Konfidenzintervall CI

Das Konfidenzintervall wird berechnet, um Informationen über die Güte der Einschätzung des Mittelwertes zu erhalten, wenn dieser auf die ganze Population und nicht nur auf eine Probe angewandt wird.

Das $100 \cdot (1 - \alpha)\,\%$ Konfidenzintervall für den gesamten Mittelwert ist gegeben durch

$$CI = t_{(\alpha/2);N-1} \cdot S_M$$

mit:

$t_{(\alpha/2);N-1}$ Prozentpunkt der t-Verteilungstabelle bei einer Risikowahrscheinlichkeit von α

Für die erweiterte Statistik im Sequenz Summary-Report kann das 95% Konfidenzintervall verwendet werden ($\alpha = 0.05$).

Die t Verteilung (oder 'Student-Verteilung') muss bei kleinen Probenvolumen verwendet werden. Im Falle großer Probenvolumina differieren die Ergebnisse für die t-Verteilung und die Normal(Gauss)-Verteilung nicht mehr. Deshalb kann bei 30 oder mehr Proben stattdessen die Normalverteilung verwendet werden (es wäre sehr schwierig, die t-Verteilung für eine große Probenanzahl zu berechnen, die Normalverteilung ist die beste Annäherung daran).

Beispiel

95% Konfidenzintervall für 6 Proben:)
$1 - \alpha = 0{,}95$
$N = 6$
Der korrekte Wert für t muss aus der t-Verteilungstabelle für 5 (N-1) Freiheitsgrade genommen werden und für den Wert $\alpha/2$, der 0,025 entspricht. Daraus ergibt sich die folgende Berechnungsformel für CI:

$$CI = 2.571 \cdot \frac{1}{\sqrt{6}} \cdot S_M$$

Regressionsanalyse

Mit:

N = Anzahl der Einzelbeobachtungen

X_i = Unabhängige Variable, i-^{te} Beobachtung

Y_i = Abhängige Variable, i-^{te} Beobachtung

Geradengleichung: $y_{(X)} = a + bX$

Koeffizienten:

$$a = \frac{1}{\Delta_X}\left(\sum_{i=1}^{N} X_i^2 \cdot \sum_{i=1}^{N} Y_i - \left(\sum_{i=1}^{N} X_i \cdot \sum_{i=1}^{N} X_i Y_i\right)\right)$$

Definitionen der Reproduzierbarkeit

$$b = \frac{1}{\Delta_X}\left(N \cdot \sum_{i=1}^{N} X_i Y_i - \left(\sum_{i=1}^{N} X_i \cdot \sum_{i=1}^{N} Y_i\right)\right)$$

mit:

$$\Delta_X = N \cdot \sum_{i=1}^{N} X_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{N} X_i \right)^2$$

Regressionskoeffizient

$$r = \frac{\left(N \cdot \sum_{i=1}^{N} X_i Y_i - \sum_{i=1}^{N} X_i \cdot \sum_{i=1}^{N} Y_i \right)}{\sqrt{\Delta_x \cdot \Delta_y}}$$

mit:

$$\Delta_Y = N \cdot \sum_{i=1}^{N} Y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^{N} Y_i \right)^2$$

Standardabweichung (S)

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{N} (Y_i - a - bX_i)^2}{N-2}}$$

Interner gespeicherter Doppelpräzisions Zahlenzugriff

Für Validierungszwecke kann eine manuelle Neuberechnung der ChemStation Ergebnisse, wie Kalibrierkurven, Korrelationskoeffizienten, theoretische Trennböden u.s.w. notwendig sein. Dabei muss das in der ChemStation verwendete Zahlenformat berücksichtigt werden.

Für alle in der ChemStation intern gespeicherte Zahlen wird der “C” Datentyp DOUBLE verwendet. Dies bedeutet, dass für jede Zahl 14 signifikante Stellen gespeichert werden. Die Implementierung dieses Datentyps folgt der Microsoft Implementierung des IEEE Standards für den “C” Datentyp und die damit verbundenen Rundungsregeln (siehe Microsoft Dokumentationen Q42980, Q145889 und Q125056).

Entsprechend der unbegrenzten Anzahl Parameter, die für die Berechnung der Kalibriertabelle verwendet werden können, ist es nicht möglich, den exakten Fehler zu berechnen, der sich durch die Fortpflanzung und Aufaddierung von Rundungsfehlern ergibt. Gründliches Testen mit verschiedenen Kalibrierkurven-Konstruktionen hat jedoch gezeigt, dass die Genauigkeit von bis zu 10 Stellen garantiert werden kann. Da die Wiederholbarkeit von chromatographischen Analysen die Fläche, Höhe und Retentionszeit betreffend 3 signifikante Stellen besitzt, ist die Verwendung von 10 signifikanten Stellen während der Berechnung ausreichend. Aus diesem Grund werden bei der Kalibrierung und anderen Tabellen maximal 10 signifikante Stellen angegeben.

Wird für die Validierung eine externe (manuelle) Berechnung benötigt, wird empfohlen, alle für die interne Berechnung angewendeten Stellen zu benutzen. Die Verwendung der angezeigten und/oder gerundeten Daten bei der externen Berechnung kann durch Rundungsfehler zu anderen Ergebnissen führen, als die ChemStation ermittelt hat.

Im folgenden Abschnitt wird beschrieben, wie alle intern gespeicherten Stellen für Zahlen, die typischerweise für manuelle Berechnungen benötigt werden, erreicht werden können. In allen Fällen muss vor der Eingabe der aufgelisteten Befehle eine Datendatei geladen und ein Report mit der geeigneten Reportvorlage erstellt werden. Alle Befehle werden in der ChemStation Befehlszeile eingegeben, die vom Menü View aus verfügbar gemacht werden kann. Die Information in der Datei

“C:\HPCHEM\TEMP.TXT” kann mit Hilfe von NOTEPAD oder einem geeigneten Text-Editor angesehen werden.

Rohpeakinformation:

- Retentionszeit
- Fläche
- Mindest-
- Breite (Integrator)
- Symmetrie
- Peak Startzeit
- Peak Endzeit

Verwenden Sie folgenden Eintrag in der Befehlszeile:

```
DUMPTABLE CHROMREG, INTRESULTS,”C:\HPCHEM\1\TEMP\INTRES.TXT”
```

Bearbeitete Peakinformation:

- Gemessene Retentionszeit
- Erwartete Retentionszeit
- Fläche
- Mindest-
- Breite (Integrator)
- Symmetrie
- Halbe Breite - Halbe Peakhöhe (Leistungstest & Erweiterter Leistungstest)
- Tailingfaktor (Leistungstest & Erweiterter Leistungstest)
- Selektivität (Leistungstest & Erweiterter Leistungstest)
- K‘ (Erweiterter Leistungstest)
- Tangenten-Peakbreite (Erweiterter Leistungstest)
- Verzerrung (Erweiterter Leistungstest)
- Theoretische Trennböden - Halbe Breite (Leistungstest & Erweiterter Leistungstest)
- Theoretische Trennböden - Tangente (Erweiterter Leistungstest)

- Theoretische Trennböden – 5-Sigma (Erweiterter Leistungstest)
- Theoretische Trennböden - Statistisch (Erweiterter Leistungstest)
- Auflösung - Halbe Breite (Leistungstest & Erweiterter Leistungstest)
- Auflösung - Tangente (Erweiterter Leistungstest)
- Auflösung – 5-Sigma (Erweiterter Leistungstest)
- Auflösung - Statistisch (Erweiterter Leistungstest)

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE CHROMRES, PEAK,"C:\HPCHEM\1\TEMP\PEAK.TXT"
```

Bearbeitete Substanzinformation:

- Berechnete Menge

Verwenden Sie den Befehlszeileneintrag:

```
DUMPTABLE CHROMRES, COMPOUND,"C:\HPCHEM\1\TEMP\COMPOUND.TXT"
```

Kalibriertabelleninformation:

- Stufenzahl
- Menge
- Fläche
- Mindest-

Verwenden Sie folgenden Eintrag in der Befehlszeile:

```
DUMPTABLE _DAMETHOD, CALPOINT,"C:\HPCHEM\1\TEMP\CALIB.TXT"
```

Lineare Regressionsinformation:

- Y-Achsenabschnitt (CurveParm1)
- Steigung (CurveParm2)
- Korrelationskoeffizient

Verwenden Sie folgenden Eintrag in der Befehlszeile:

```
DUMPTABLE _DAMETHOD, PEAK,"C:\HPCHEM\1\TEMP\REGRESS.TXT"
```

14

Überprüfung des Systems

Überprüfung des Systems

Die Systemüberprüfung ist ein Schlüsselbaustein in der Qualitätssicherung des Routinebetriebs eines analytischen Labors. Die Möglichkeiten der ChemStation zur Überprüfung nach GLP sind so ausgelegt, daß Ihnen folgende Hilfen zur Verfügung stehen: Überprüfung korrekter Funktionsweise der Software oder wichtiger Softwarekomponenten zum jetzigen Zeitpunkt oder zum Zeitpunkt einer bestimmten Analyse.

Die Funktion zur Überprüfung der ChemStation ermöglicht Ihnen die Überprüfung der korrekten Funktion Ihrer ChemStation Software. Sie können dies durch Nachbearbeitung Ihrer Datensätze mit speziellen Methoden erreichen und die Ergebnisse mit definierten Standards vergleichen. Die Überprüfung ist besonders wichtig zur Sicherstellung der Zuverlässigkeit der Daten aus Integration und Quantifizierung.

Sie können den Standard Test zur Überprüfung verwenden oder Ihre eigenen Tests mit unterschiedlichen Methoden und Datensätzen definieren, um die Kombinationen der bei Ihrer Methode verwendeten Rechensoftware zu prüfen. Der Überprüfungstest ist eine geschützte Datei, die nicht geändert oder gelöscht weden kann.

Der Befehl “Verification” unter “Data Analysis” ermöglicht es Ihnen, eine der folgenden Optionen auszuwählen:

- Durchführung einer Überprüfung aus der Datenbank
- Definition eines neuen Verfahrens für eine Überprüfung und Hinzufügen zur Datenbank
- Löschen einer Überprüfung aus der Datenbank

Im Abschnitt “How To” des Online-Hilfe Systems wird beschrieben, wie diese Aufgaben durchgeführt werden können. Während einer Überprüfung der ChemStation können Sie wählen, ob der gesamte Test oder nur Teile des Test durchlaufen werden sollen.

Die Ergebnisse aus Überprüfungstests werden im Binärformat standardmäßig im Verzeichnis c:\hpchem\1\Verify zusammen mit Methoden

und Datensätzen gespeichert. Das Unterverzeichnis Verify steht auf derselben Ebene wie die Verzeichnisse der Sequenzen, Methoden und Datensätze. Sie können die Ergebnisse an eine Datei oder auf einem Drucker ausgeben. Die Testergebnisse einschließlich der Testergebnisse für kombinierte Überprüfungen werden mit “Test bestanden” bzw. “Test nicht bestanden” bewertet.

Für die Überprüfungstests stehen folgende Komponenten zur Verfügung:

Digitale Elektronik (nur für HP 1050 DAD und Agilent 1100 Series DAD)

Im Dioden-Array-Detektor ist ein Testchromatogramm gespeichert. Dieses Chromatogramm wird zur ChemStation geschickt, nachdem es dieselben Bearbeitungsschritte durchlaufen hat wie normale Rohdatensätze von den Photodioden. Die daraus resultierenden Daten werden mit den Ursprungsdaten verglichen, die für dieses Testchromatogramm in der ChemStation abgelegt sind. Wenn die Werte nicht übereinstimmen, gilt der Test als nicht bestanden. Dieser Test stellt sicher, daß die Elektronik des DAD, die die Daten bearbeitet, richtig funktioniert. Es wird ein gespeichertes Testchromatogramm verwendet; d.h. die Lampe und der Dioden-Array sind nicht an diesem Test beteiligt. Sie können mit Hilfe des Abschnitts “Die Funktion “DAD Test”” auf Seite 293 überprüft werden.

Peakintegration

Der Datensatz wird noch einmal mit der Ursprungsmethode integriert und die Ergebnisse mit den im Überprüfungsregister gespeicherten Ursprungsdaten verglichen. Wenn die Werte nicht übereinstimmen, gilt der Test als nicht bestanden.

Quantifizierung der Substanzen

Die Substanzen des Datensatzes werden noch einmal quantifiziert und die Ergegnisse mit den im Überprüfungsregister gespeicherten Ursprungsdaten verglichen. Wenn die Werte nicht übereinstimmen, gilt der Test als nicht bestanden.

Drucken der Reports

Der Originalreport wird noch einmal gedruckt.

Folgende Seite zeigt ein Beispiel für einen erfolgreich durchgeführten Verifikationstest.

```
=====================================================================
              ChemStation Verification Test Report
=====================================================================
Tested Configuration:
   Component                Revision              Serial Number
---------------------------------------------------------------
  LC 2D ChemStation      A.05.01               N/A
  Microsoft Windows        3.95 (enhanced mode)  N/A
  MS-DOS                   7.0                   N/A
  Processor                Pentium               N/A
  CoProcessor              yes                   N/A
ChemStation Verification Test Details:
  Test Name                     : C:\HPCHEM\1\VERIFY\DEFAULT.M
  Original Data File            : C:\HPCHEM\1\VERIFY\DATA\NV-0019.D
  Original Acquisition Method   : TC1ISO2.M
  Original Data Analysis Method : TC1ISO2.M
  Original Operator             : Agilent Technologies
  Original Injection Date       : WEd Feb 17 08:59:51 1997
  Original Sample Name          :
Signals Tested:
  Signal  1: DAD1 A, Sig=254,4 Ref=450,80 of  NV-0019.D
  Signal  2: VWD1 A, Wavelength=254 nm of  NV-0019.D
ChemStation Verification Test Results:
  Test Module            Selected  For Test     Test Result
  ------------------------------------------------------------------
  Digital electronics test   No                    N/A
  Integration test          yes                   Pass
  Quantification test       yes                   Pass
  Print Analytical Report    No                   N/A

ChemStation Verification Test Overall Results:     Pass
```

Darstellungen für Überprüfungen und Fehlererkennungen

Die ChemStation bietet zur Durchführung von Überprüfungen und Fehlererkennungen zwei zusätzliche Darstellungen, wenn dies vom konfigurierten Gerät unterstützt wird, wie z.B. den LC-Modulen der Serie Agilent 1100. Weitere Informationen dazu finden Sie in der Online-Hilfe und im Handbuch *Performance Verification*.

Das Register “GLPsave”

Das Register “GLPsave” wird am Ende jeder Analyse gespeichert, wenn diese Option in der Runtime-Checkliste angewählt ist. Es enthält folgende Informationen:

- die Signale
- das Logbuch
- die Tabelle mit den Integrationsergebnissen
- die Tabelle mit den Quantifizierungsergebnissen
- Daten zur Gerätefunktion
- die Methode zur Datenauswertung

Dieses Register ist eine vollständige, geschützte Aufnahme, die beim Analysenlauf erstellt wird. Sie können es jederzeit aufrufen, wenn Sie einmal Ihre Analysenmethode überprüfen wollen.

Die Option “GLPsave Register” unter “Data Analysis” ermöglicht es Ihnen, die Daten im Register “GLPsave” jederzeit einzusehen. Die entsprechende Datei ist durch eine Kontrollzahlsumme geschützt und als Binärcode verschlüsselt, damit sie nicht verändert werden kann.

Im Dialogfeld zur Ansicht des Registers “GLPsave”, können Sie folgende Optionen auswählen:

- Laden der Ursprungsmethode
- Laden der Ursprungssignale
- Laden der Daten zur Gerätefunktion
- Ausdruck der Ursprungsmethode
- Ausdruck der ursprünglichen Integrationsergebnisse
- Ausdruck der ursprünglichen Quantifizierungsergebnisse
- Erstellen eines Originalreports aus Ursprungsmethode und -signalen.

Mit Hilfe der Funktion zur Ansicht der GLP können Sie zeigen, daß es sich bei Ihren Chromatogrammen um Originaldaten handelt. Weiterhin läßt sich anhand der Daten zur Gerätefunktion die Qualität der Analyse unter Beweis stellen und die Berechtigung der Datenbewertung demonstrieren.

Sie können beispielsweise:

- den Datenauswertungsteil der Methode, die zum Zeitpunkt der Datenauswertung verwendet wurde, neu laden und ausdrucken, um zu beweisen, daß die in den Ergebnissen dargestellte Datenauswertung für die Analyse in keiner Weise verändert wurde;
- die Integrations- und Quantifizierungsergebnisse ohne erneute Berechnung aufrufen, um die Echtheit des Reports unter Beweis zu stellen.

Die Funktion “DAD Test”

In einem Labor mit GLP-Standard können Detektortests dazu verwendet werden, routinemäßig Systembewertungen für ein Analysengerät durchzuführen.

Der DAD-Test prüft die Funktionen Ihres Dioden-Array-Detektors. Wenn Sie aus dem Menü “Instrument” (nur für LC3D an 3DCE) den DAD-Test auswählen, wird das Gerät auf seine Intensität und Wellenlängenkalibrierung hin geprüft. Wenn Sie “Save” betätigen werden die Testergebnisse automatisch in der DADTest-Datenbank gespeichert. Dabei handelt es sich um ein Datenregister, das mit DADTest.Reg benannt und im Standardverzeichnis für das Gerät abgelegt ist.

Die Funktion “Review DAD Test”

Die Funktion “Review DAD Test” im Menü “View” der Datenanalyse ermöglicht es Ihnen, die Datei DADTest.Reg jederzeit einzusehen. Die Datei wird durch eine Kontrollzahlsumme geschützt und als Binärcode verschlüsselt, damit sie nicht verändert werden kann.

Sie können folgende Teile des DAD-Tests zur Wiedereinsicht auswählen:

Anzeige der Heliumspektren (Show Holium Spectra)

Stellt alle in der Anzeigetabelle des DAD-Tests aufgeführten Holmiumspektren dar. Das aktive Spektrum ist markiert.

Anzeige der Intensitässpektren (Show Intensity Spectra)

Stellt alle in der Anzeigetabelle des DAD-Tests aufgeführten Intensitätsspektren dar. Das aktive Spektrum ist markiert.

Speichern unter einer neuen Datenbank (Save as New Database)

Wenn Sie die Lampe Ihres DAD auswechseln, können Sie den DAD-Test wieder in die Ausgangssituation zurückstellen, um ungewollte Testergebnisse aus der Tabelle zu löschen. Danach können Sie die Funktion “Save As New Database” einsetzen.

Anzeige der gewählten Spektren (Show Selected Spectra)

Stellt nur die in der Tabelle ausgewählten Spektren dar.

Anzeige eines Intensitässchaubilds (Show Intensity Graph)

Sie können ein Intensitätsschaubild auf dem Bildschirm darstellen, um die Lebensdauer der Lampe Ihres Dioden-Array-Detektors abschätzen zu können. Das Schaubild liefert eine Funktion der maximalen Lampenintensität gegen die Zeit.

Index

A
abbrechen
  einer Sequenz, 204
Abhandlung über den HP Standardintegrationsalgorithmus, 71
absolut
  Responsefaktor, 165
  Retentionszeit, 151, 152
Abweichung, 182
Abweichung von Gauß-Kurve, 121
Agilent 1100 Series, 230
Agilent 1100 Series LC
  anschließen, 230
aktuell
  Methode, 46
All Valleys, 104, 145
analoges Signal, 59
Analyse
  Genauigkeit der, 195
Anfangsparameter, 91, 134
  Mindestfläche, 91
  Peakbreite, 91
  Schwellenwert, 91
angepaßte Datenauswertung, 54
angepaßte Konfiguration, 110
angepaßte Reports, 26
Anpassung
  Kurve, 188
  nicht-lineare, 187
Anzahl der Trennböden, 275
  Methode der Halbwertsbreite, 275
  Methode unter Verwendung der Varianz, 276
  Tangentenmethode, 275, 276
Anzahl der Trennböden pro Meter, 276
Area%
  Berechnung, 167
  Report, 248
ASCII-Datei, 241
Auflösung, 276
  5 Sigma-Methode, 277
  Methode der Halbwertsbreite, 277
  statistische Methode, 277
  Tangentenmethode, 276
Ausgabe
  von Reports, 254
Autointegration, 100, 142
automatisch
  Rekalibrierung, 212
  Shutdown, 211
automatische Bibliothekssuche, 53
automatischer Batch-Review, 240
Automatisierung, 28

B
baseline
  penetration, 128
Basisilinie
  Auswertung, 112
Basislinie, 79
  Anfang der, 124
  angepaßte Konstruktion, 97
  Auswertung, 79, 113
  Bestimmung, 112, 113, 123
  Definition, 112
  Ende der, 124
  Kodierung, 104, 145
  Konstruktion einer modifizierten, 126
  Konstruktionsparameter, 97
  modifizierte, 86
  Schneiden der, 86
  standardmäßige Konstruktion, 123
Basislinie ziehen, 104, 145
Batch, 238
Batch-History, 241
Batch-Report, 239
Batch-Tabelle, 238
Benutzeroberfläche, 239
Berechnung
  kalibrierte Rechenverfahren, 168
  mit ESTD, 169
  mit ISTD, 172
  Norm%, 171
  unkalibrierte Rechenmethoden, 167
  zur Quantifizierung, 164
Berechnung der Peaksymmetrie, 268
Bereiche
  der Kalibrierung, 186
Bestimmung des Rauschens, 265, 266
  mit der ASTM-Methode, 266
Bestimmungsgrenzen, 185

C
Checkliste zur Ausführung
  Datenauswertung, 53
  Datenerfassung, 52
  Post-Run Befehl, 54
  Post-Run Makro, 54
  Pre-Run Befehl, 52
  Pre-Run Makro, 52
  Speichern der GLP-Daten, 54
  Speichern einer Kopie der Methode, 55
ChemStation
  allgemeine Beschreibung, 13
  Anschließen einer LC der Agilent 1100 Serie, 230
  weitgehende Anpassung, 28
CI, 279
Control Chart Reports, 26
CSV-Datei, 241

D
Datei
  Daten, 61
  Erweiterung, 61
  Methode, 50
  Name, 61
  Report, 61
Datenauswertung
  angepaßte, 54
  Integration, 21
  Quantifizierung, 22
  Reports, 23
  Spezielle Reports, 23
Datenerfassung, 19
  Was ist Datenerfassung?, 59
Datensatz
  chromatographisch, 61
  spektral, 61
Definition für Linearitätstests, 278
Definitionen der Reproduzierbarkeit, 278
delta%, 215
Detektorresponse, 184, 185, 246
Dialogfeld "Calibration Settings", 175
DIF-Datei, 241
digitales Signal, 59
Drift
  der Response, 226

E
Einpunktkalibrierkurve, 184

einzelne Referenzpeaks, 154
Ereignismeldungen, 63
Ersetzen (Replace), 213
Erweiterung
  Datei, 61
ESTD
  Berechnung, 169
  Report, 246, 248
  Verfahren, 169
Excel-Datei, 241
explizit
  Kalibriersequenzen, 217
externer Standard, 169
Extrapolation, 186, 226

F
Fehlermeldungen, 63
  einer Sequenz, 207
Fenster
  Referenz, 153
  Retentionszeit, 153
Fläche
  Mindest-, 94
  Parameter, 97
Formeln
  allgemeine Definitionen, 271
  Definitionen des Leistungstests, 272
Formeln für die Systemleistung
  Anzahl der Trennböden, 275
  Auflösung, 276
  Kapazitätsfaktor, 274
  Mittelwert, 278
  Nullzeit, 271
  Peakbreite, 274
  Peaktailing nach USP, 274
  Regressionsanalyse, 280
  Regressionskoeffizient, 282
  relative Retention, 276
  relative Standardabweichung, 279
  Retentionszeit einer nicht retardiertenSubstanz, 271
  Standardabweichung, 278, 282
  Totvolumen, 271
  Totzeit, 271
Funktion des neuen Integrators, 111

G
Genauigkeit
  der Analyse, 195
Gerät
  Response, 226
  Status des, 65
Gerätesteuerung, 33
  Netzwerke, 33
Gewichtung
  der Kalibrierpunkte, 188
  gleich, 188
  linear, 188
  quadratisch, 188
GLPSave.Reg, 54
  mit der Methode speichern, 54
Grenzwerte, 239
Gute Laborpraxis (Good Laboratory Practice, GLP), 29

H
Height%
  Berechnung, 167
  Report, 248

I
Integration, 53, 102
  Anpassung, 96, 137
  Ergebnistabelle, 53
  isolierte Peaks, 79
  Kontrollparameter, 97
  manuell, 103
  Methoden, 99
  neuen, 71
  Parameter, 77, 91, 134
  Parametertabelle, 102, 139
  Peakschultern, 81
  Strichmarkierungen, 70
  überlappender Peaks, 81
  Was ist eine Integration?, 77
Integrationsparameter, 53
interner Standard, 172
Intervall
  der Rekalibrierung, 214
ISTD
  Berechnung, 172
  Peaks auffinden, 159
  Report, 247
  Verfahren, 172

K
Kalibrierkurve
  Anpassung, 188
  Arten, 184
  Beschreibung der, 181
  Einpunktkalibrierung, 184
  Gewichtung des Kalibrierpunkts, 188
  Mehrpunktkalibrierung, 185
  Verlauf durch Ursprung erzwingen, 188
  Was ist eine Kalibrierkurve?, 181
Kalibriertabelle, 149
  Was ist eine Kalibriertabelle?, 180
Kalibrierung, 179
  Bereiche der, 186
  explizite, 217
  Häufigkeit, 214
  Kurve, 181
  Kurvenanpassung, 188
  Mehrpunkt-, 185
  Probe, 179, 185
  Punkt, 179
  Stufe, 179
  Substanz, 179
  umschließende, 214
  zyklische, 218
Kapazitätsfaktor, 274
Kapazitätsverhältnis, 274
Kardinalpunkte, 80
Konfidenzintervall, 279
Konfiguration, 17
  angepaßte, 110
Konstruktion einer modifizierten Basislinie, 86
Kontrolle, 238
Koordinatenursprung
  Behandlung, 188
  einbeziehen, 188
  erzwingen, 188
  ignorieren, 188
  verbinden, 188
Kopfzeile, mehrzeilig, 239
Korrekturfaktoren, 165
korrigierte Retentionszeit, 151, 154
Kurve
  Anpassung, 188
  Kalibrierung, 181

L
Laufindex, 238
Leistungstest Definitionen
  statistische Momente, 272
Logbuch, 61, 63
Logbuchdatei
  einer Sequenz, 207
Löschen von Peaks, 104, 145
Lösungsmittelpeak, 84, 86, 89, 125, 132
Lotfällung, 81

M
Makro
  Shutdown, 211
Manuelle Integration, 144
manuelle Integration, 103
  alle Talpunkte, 104, 145
  Basislinie ziehen, 104, 145
  Codes zur Trennung, 104, 145
  Löschen von Peaks, 104, 145
  negative Peaks, 104, 145
  Peaktrennung, 104, 145
  tangentiale Anpassung, 104, 145
  Trace Mode, 104, 145
  Vorgehensweise, 104, 145
manuelle Parameter
  einfügen, 146
manueller Batch-Review, 240
Maus
  rechter Mausknopf, 104, 145
mehrere
  Referenzpeaks, 155
Mehrpunktkalibrierung, 172, 185
  Kalibrierkurve, 185
mehrzeilige Kopfzeile, 239
Mengenangaben, 151
Methode, 238
  Ablauf, 51
  aktuelle, 46
  automatische Bibliothekssuche, 53
  Bestandteile, 44
  editieren, 48
  erstellen, 47
  gespeicherte, 46
  GLPSave.Reg, 54
  Information, 44
  Integration, 53
  Integrationsparameter, 53
  Standard-, 46
  Status, 46, 65
  Überprüfen der Peakreinheit, 53
  verändern, 47
  Verzeichnis, 50
  Warten, 211
  Was ist eine Methode?, 43
  Zusammenfassung des Ablaufs, 56
Methodendatei
  Geräteparameter, 50
  Parameter für die Datenauswertung, 50
Microsoft Excel-Datei, 241
Mindesthöhe, 134
Mittelwert (average), 214
Monitor
  für Signale, 62
  Gerätestatus, 65
Multiplikationsfaktor, 165, 170

N
Name
  einer Sequenzdatei, 209
negative Peaks, 104, 145
negativer Peak, 84, 125
neuer HP Integrator
  Anwendung, 140
Nicht zugeordnete Peaks, 130
nicht zugeordnete Peaks, 125
nicht-linear
  Kurvenanpassung, 187
No Update, 213
Norm%
  Berechnung, 171
  Report, 171, 248
Normalisierungsfaktor, 172
Not Ready Timeout, 211
Nullprobe
  Analysenlauf, 209
Nullzeit, 271

O
Online
  Monitore, 62
Online-Hilfe, 34

P
Parameter
  Anfangs-, 91
  -arten, 91
  Integrations-, 91
  zeitprogrammierbare, 97
partielle Rekalibrierung, 195
pausieren
  einer Sequenz, 205
Peak
  Algorithmus für Maximum, 121
  -anfang, 80, 113
  Ausschlußkriterien, 94
  -breite, 91, 117
  Bündeln, 119
  Codes zur Trennung, 84, 125
  Durchführung der Identifizierung, 159
  -ende, 80, 113
  Erkennung, 79
  -erkennung, 117
  Flächenberechnung, 131
  -höhe, 167
  Identifizierung, 53, 149
  Integration, 77
  Krümmung, 80
  Lösungsmittel, 86
  -maximum, 113
  -parameter, 91
  Qualifier, 150, 151
  -qualifier, 156
  Quantifizierung, 53, 163
  Regeln zur Übereinstimmung, 150
  Response, 156
  Retentionszeit, 154
  Retentionszeitfenster, 153
  -schulter, 81
  Steigung, 80
  überlappend, 81
Peakbreite, 274
  2,35 Sigma, 274
  4,4% der Höhe, 274
  5 Sigma Breite, 274
  auswählen, 135
  Basisbreite WB, 274
  bei 5% der Höhe, 274
  Bereich, 93
  Einfluß der, 94
  halbe Höhe, 274
  Tangente, 274

verändern, 94
Peakidentifizierung
Möglichkeiten, 151
Was ist Peakidentifizierung?, 149
Peakreinheit, 53
Peaks
in der Praxis, 115
Peakschultern
Detektion, 91, 94
Peaktailing, 274
Peaktailing nach USP, 274
Post-Run
Befehl, 54
Makro, 54
Post-Sequenz Aktionen, 211
Präzision
Zahlenformat, 283
Pre-Run
Befehl, 52
Makro, 52
Probe
Kalibrierung, 179, 185
-menge, 165
unbekannte, 183
Vorzugsproben, 204
Probenart, 238
Probenart "removed" (entfernt), 238
prozentuale Berechnung, 167

Q
Qualifier, 156
Quantifizierung
Berechnungen, 164
ESTD-Verfahren, 169
ISTD-Verfahren, 172
Was ist Quantifizierung?, 163
quantitative Ergebnisse, 248

R
Referenzfenster, 153
Referenzpeaks
Anwendung, 154
auffinden, 159
einzelne, 154
mehrere, 155
Regression
Regressionskoeffizient, 282
Regressionsanalyse, 280
Rekalibrierung, 195
automatische, 212
Intervall, 214
partielle, 195
Retentionszeit, 195
unidentifizierter Peaks, 195
vollständige, 195
Warum Rekalibrierung wichtig ist, 195
Was ist Rekalibrierung?, 195
relative Retention, 276
Report
Area%, 248
Ausgabe, 254
Control Chart, 26
Dateiformate, 254
Datensatz, 61
ESTD, 246, 248
Height%, 248
kalibrierter, 246
Layout, 26
Norm%, 248
Sequence Summary, 25
unkalibrierter, 246
-vorlagen, 250
Was ist ein Report?, 245, 248
zur Systemeignung, 23
Report zur Systemeignung
Extended Performance, 24
Performance and Noise style, 24
Performance Report, 23
Reports zur Systemeignung, 23
Response, 163, 183
Detektor, 184
Drift, 226
Verhältnis, 156
Responsefaktor
absoluter, 165
Update, 213
Retentionszeit, 271
absolute, 151, 152
Fenster, 153
korrigierte, 151, 154
Rekalibrierung, 195
Update, 213
Run-Time Checkliste, 45, 49, 51

S
Schneiden
der Basislinie, 86
Schultererkennung, 135
Schultern
Integration, 81
Schwellenwert, 93
Einfluß des, 94
verändern, 94
Sequence Summary Report
Analysenreports, 257
Festlegung der Ausgabe, 258
Konfiguration, 257
Kopfzeilen, 257
Logbuch, 257
Methoden, 257
Probentabelle, 257
Sequenztabelle, 257
Statistik, 257
Zusammenfassung, 258
Sequenz
abbrechen, 204
Arbeitsschritte zur umschließenden Kalibrierung, 227
Dateiname, 209
editieren, 204
erstellen, 203, 204
explizite Kalibrierung, 217
Fehlermeldungen, 207
Logbuchdatei, 207
Nullproben, 209
pausieren, 205
Probengefäße, 209
speichern, 204
stoppen, 204
umschließende Kalibrierung, 226
Unterverzeichnis, 39
Was ist eine Sequenz, 200
zyklische Kalibrierung, 218, 219, 226
Sequenzparameter
Tabelle, 201
Sequenztabelle, 202
Rekalibrierparameter, 213
Shutdown
automatisch, 211
des Systems, 211
Makro, 211
Signal

analog, 59
Details, 44
digital, 59, 79
Kennzeichnung, 61
Monitor, 62
Software-Überblick
Bertriebssystem, 17
Datenmodell, 17
Methoden und Sequenzen, 17
Systemkonfiguration, 17
Speichern der GLP-Daten, 54
Standard, 238
externer, 169
interner, 172
Standardabweichung, 182
Proben-Standardabweichung, 278
Standardabweichung des Mittelwertes, 279
Standardabweichung RSD, 279
Standardabweichung S, 282
Standby Status, 211
Status
des Gerätes, 65
Fenster, 65
stoppen
einer Sequenz, 204
Strichmarkierungen, 70, 83, 124
Substanz, 179
Substanztabelle, 238
System
Meldungen, 63
Shutdown, 211
Status, 64
Systemleistung
Grenzen der, 263
mit Statistik, 262

T
t Verteilung, 280
Table der Peaksummen, 253
Talpunkt, 81
tangentiale Anpassung, 104, 128, 145
Totvolumen, 271
Totzeit, 271
Trace Mode, 104, 144
aktivieren, 104, 145
manuelle Integration, 104, 144
TXT-Datei, 241

U
überlappende Peaks
Integration, 81
überprüfen
Unterverzeichnis, 39
Überprüfen der Peakreinheit
als Teil der Methode, 53
Überprüfung, 288
Überprüfung des Systems, 288
Umschließen (bracket), 214
Umschließend
Kalibrierung, 214
umschließende
Kalibriersequenz, 226
unbekannte Probe, 183
unidentifizierte Peaks
Klassifizierung, 160
Rekalibrierung, 195
unkalibrierte Rechenmethoden, 167
Update
der Retentionszeit, 213
des Responsefaktors, 213

V
veränderbare Integration
Parameter, 110
Verdünnungsfaktor, 165, 170
Verification, 288
Verzeichnis
Methode, 50
Vorlagen
für Reports, 250
Vorzugsprobe, 204

W
Weitgehende Anpassung, 28
Wendepunkt
Abstiegsflanke, 80
Anstiegsflanke, 80

X
XLS-Datei, 241

Z
zeitprogrammierbare Parameter, 97, 138
zusammenfassende Reports einer Sequenz (Sequence Summary Reports), 25
zyklisch
Kalibriersequenzen, 218, 219, 226

Agilent Technologies

In diesem Handbuch

In diesem Handbuch werden die verschiedenen Konzepte der ChemStation beschrieben. Sie können damit einen Einblick in die Funktionsweise Ihrer ChemStation gewinnen.

Informationen zur Verwendung der ChemStation finden Sie im Online-Hilfesystem sowie im integrierten Tutorial.

G2070-92113